1959 - 2019
SEHH 60 años
FEHH

Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia

Fundación Española de Hematología y Hemoterapia

PONENCIAS

LXI Congreso Nacional de la SEHH

XXXV Congreso Nacional de la SETH

24 - 26 octubre

2019

Valencia

PALACIO DE CONGRESOS

24 - 26 octubre 2019

www.sehhseth.es

Valencia

LXI Congreso Nacional de la SEHH

XXXV Congreso Nacional de la SETH

Comité Organizador

Presidente
Dr. Carlos Solano Vercet

Vicepresidenta
Dra. Pilar Medina Badenes

Vocales
Dra. Cristina Arbona Castaño
Dr. Santiago Bonanad Boix
Dra. Marisa Calabuig Muñoz
Dr. Guillermo Cañigral Ferrando
Dra. Ana Rosa Cid Haro
Dr. Javier de la Rubia Comos
Dr. Francisco España Furió
Dra. María Guinot Martínez
Dr. Juan Carlos Hernández Boluda
Dra. Francisca López Chuliá
Dr. Pascual Marco Vera
Dr. Manuel Miralles Hernández
Dra. Blanca Navarro Cubells
Dra. Silvia Navarro Rosales
Dra. Ana Julia Oto Martínez
Dr. Jaime Sanz Caballer
Dr. Guillermo Sanz Santillana
Dra. M.ª José Terol Casterá
Dra. Anabel Teruel Casasús
Dra. Mar Tormo Díaz

Comité Científico

Comité Científico de la SEHH

Presidente
Dr. José Antonio Pérez Simón

Vocales
Dra. Beatriz Arrizabalaga Amuchástegui
Dr. José Luis Arroyo Rodríguez
Dra. Gemma Azaceta Reinares
Dr. Valentín García Gutiérrez
Dr. Juan Carlos Hernández Boluda
Dr. Miguel Teodoro Hernández García
Dra. Concepción Herrera Arroyo
Dra. Lucía López Corral
Dr. Joaquín Martínez López
Dr. Pau Montesinos Fernández
Dr. Guillermo Rodríguez García
Dr. Francesc Solé Ristol
Dr. Álvaro Urbano Ispizua
(coordinador del Programa Educacional)
Dra. Lucrecia Yáñez San Segundo

Comité Científico de la SETH

Presidenta
Dra. María Eva Mingot Castellano

Vocales
Dra. M.ª Teresa Álvarez Román
Dr. Ángel Bernardo Gutiérrez
Dra. Ana Rosa Cid Haro
(coordinadora del Programa Educacional)
Dr. Jorge Cuesta Tovar
Dr. Antonio Moscardó Martínez
Dra. Elena Pina Pascual

Junta Directiva de la SEHH

Presidente
Dr. Jorge Sierra Gil
Presidente electo
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
Dr. José Ángel Hernández Rivas
Dr. Valentín Cabañas Perianes
Dr. José Tomás Navarro Ferrando
Dra. Ana Batlle López
Dra. Ángela Figuera Álvarez
Dra. M.ª Teresa Molero Labarta
Dra. Marta Morado Arias
Dra. Carolina Moreno Atanasio

Expresidentes de la SEHH
Dr. José M.ª Moraleda Jiménez
Dra. Carmen Burgaleta Alonso de Ozalla
Dr. Evarist Feliu Frasnedo
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. Jerónimo Forteza Bover
Dr. Pedro Farreras Valentí
Dr. Agustín Aznar Gerner

ÍNDICE

XXXII Lección conmemorativa Antonio Raichs

Estudio de la enfermedad mínima residual en hemopatías malignas. Métodos y aplicaciones 9
Marcos González Díaz

ADN tumoral libre circulante en el diagnóstico hematológico 17
Coordinadores: Joaquín Martínez López, Blanca Ferrer Lores

Importancia del estudio del ADN libre circulante en el diagnóstico de los tumores hematológicos 19
Beatriz Bellosillo

ADN tumoral libre circulante en leucemia 22
Rosa Ayala

Circulating tumor DNA in diagnostic hematology: "case study" of multiple myeloma 28
Suzanne Trudel, Trevor J. Pugh

Neoplasias mieloproliferativas crónicas Filadelfia negativas 33
Coordinadores: Juan Carlos Hernández Boluda, Manuel Pérez Encinas

Infections in patients with myelofibrosis and polycythemia vera treated with ruxolitinib 34
Francesca Palandri, Christian Di Pietro

Tratamiento actual de la trombocitemia esencial y la policitemia vera 39
Alberto Álvarez Larrán

Nuevos avances y su impacto en el manejo del linfoma folicular 43
Coordinadores: Guillermo Rodríguez García, Izaskun Zeberio Etxetxipia

Enfermedad mínima residual y nuevos *endpoints* en linfoma folicular 44
Juan Manuel Sancho Cia

Nuevos tratamientos de primera línea en el linfoma folicular: ¿podemos realizar un tratamiento personalizado? 50
Miguel Ángel Canales Albendea

Tratamiento del linfoma folicular en recaída o refractario. 52
Laura Magnano, Alfredo Rivas-Delgado, Armando López-Guillermo

Medicamentos innovadores y sostenibilidad del Sistema Sanitario 58
Coordinadores: Concepción Herrera Arroyo, Jesús María Hernández Rivas

La visión de los hematólogos (el mieloma como modelo) 59
Jesús San Miguel Izquierdo, Alfonso Santiago Marí, Juan José Lahuerta

Gammapatías monoclonales 62
Coordinadores: Miguel T. Hernández García, Javier de la Rubia Comos

Mieloma Múltiple: más allá de la Remisión Completa 64
Juan José Lahuerta

Inmunoterapia en el mieloma 72
Paula Rodríguez Otero

Macroglobulinemia de Waldenström 78
Ramón García Sanz, Cristina Jiménez, Verónica González de la Calle, M. Isabel Prieto-Conde, María García-Álvarez, Alejandro Medina, M. Eugenia Sarasquete, Miguel Alcoceba, Noemí Puig, Norma C. Gutiérrez, M. Carmen Chillón, Marcos González-Díaz

Tratamiento de la leucemia mieloide aguda en la era molecular. 82
Coordinadores: Pau Montesinos Fernández, Jordi Esteve Reyner

Estrategias curativas adaptadas al riesgo en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda: presente y futuras direcciones 83
Miguel A. Sanz

Avances en Eritropatología 87
Coordinadores: Beatriz Arrizabalaga Amuchástegui, Ana Villegas Martínez

Novedades terapéuticas en talasemias y drepanocitosis 88
Rafael del Orbe Barreto

Tratamiento de la púrpura trombótica trombocitopénica: nuevas estrategias 92
F. Ataúlfo González Fernández

Avances en la enfermedad por aglutininas frías 98
Montserrat López Rubio, Isabel Gutiérrez Jomarrón

Síndromes linfoproliferativos 106
Coordinadores: Javier de la Serna Torroba, Lucrecia Yáñez Sansegundo

Complicaciones infecciosas en los síndromes linfoproliferativos 107
Mariana Chumbita, Carolina García-Vidal

Diagnóstico y tratamiento de la tricoleucemia 110
Ana Marín-Niebla, Elisa Roldán

Actualización en medicina transfusional 119
Coordinadores: José Luis Arroyo Rodríguez, Cristina Arbona Castaño

Pruebas pretransfusionales en paciente tratado con anti-CD38 120
Olga López Villar

Transfusión de plaquetas en situaciones especiales 123
Javier Anguita Velasco

Nuevos estándares CAT en transfusión 128
José M.ª García Gala

Terapia génica y celular en hematología 130
Coordinadores: Jorge Sierra Gil, José Antonio Páramo Fernández

Gene therapy for haemophilia 132
John Pasi

CAR-T en mieloma múltiple 133
Javier Briones

Aspectos éticos y jurídicos de la terapia génica 136
Pilar Nicolás Jiménez

Grupo Español de Citología Hematológica (GECH). Casos clínicos citológicos 141
Coordinadores: Esperanza Tuset Andújar, José Tomás Navarro Ferrando

Caso 1. Anemia con blastos en sangre periférica 142
Patricia Carrascosa Mastell, M.ª Dolores Linares Latorre, Teresa Martínez Gaspar,
Manuel Fernández-Delgado Momparler, Diana Margarita Trejos Carvajal, Juana M.ª Clavel Pía,
Luis Serrano Picazo, Carolina Cañigral Ortiz, Aima Lancharro Anchel, Adriana Gascón Buj,
Nuria Claros Barrachina, Raimundo García Boyero, Guillermo Cañigral Ferrando

Caso 2. Varón con hiperleucocitosis y visión borrosa 147
Sonia Daza Pozo, M.ª de la O Abío Calvete, M.ª Carmen Toledo Ruiz, Laura Parrilla Navamuel,
Karen Gabriela Albiño Salazar, Sara Moreno Ramírez, Andrea Rodríguez Hidalgo,
Noelia Rollón Simón, Esther Botón Contreras, Elisa de Diego Vázquez, Ana Muñoz Gama,
Marisol Mateo Guerrero, José Agustín Rodríguez Alén, Jorge Cuesta Tovar

Caso 3. Mujer de 39 años con lumbalgia, anemia y trombocitopenia 153
Concepción Prats-Martín, Rosario M. Morales-Camacho, Teresa Caballero-Velázquez,
Estrella Carrillo, M. Teresa Vargas, Sergio Burillo, M. Isabel Montero,
Ricardo Bernal, José Antonio Pérez-Simón, Juan José Borrero3

Caso 4. Paciente varón de 74 años con linfocitosis. El valor de la citología en un caso atípico 160
Carlos de Miguel Sánchez, Diego Robles, Laida Cuevas, Ariane Unamunzaga, Ana Vega, Ana Santamaría,
Ernesto Pérez Persona, Itziar Oiartzábal, Miren Gabilondo, Carlos Pisón, Gala Aglaia Méndez, Francisco Rodríguez,
Ángel Pereda, Carmen Menchaca, Ingrid Parra, María Julia de Diego, María José Larráyoz,
María José Calasanz, Arantza Mendizábal, José María Guinea de Castro

Caso 5. Fiebre, dolor abdominal y pancitopenia en mujer de 53 años con antecedentes de linfoma folicular en remisión 168
Carlos Bravo-Pérez, Inmaculada Pajares, Myriam Castillo, Begoña Muiña, Hugo Escobar,
M.ª Luz Amigo, Lorena Martínez-Montesinos, M.ª Dolores García-Malo, Francisco Martínez-Díaz, Jonathan García,
María Socorro Rodríguez-Pinilla, Miguel Ángel Piris, Francisco José Ortuño

Caso 6. Niño de 5 años con fiebre, dolores óseos, leucocitosis y hepatoesplenomegalia 176
Laura Lo Riso, Alejandro Formica, Marta García, Bernardo López, Julio Iglesias, Mikael Lorite, José María Sánchez Raga, José Antonio Salinas, María Antonia Durán

SMD & CHIPs (clonal hematopoiesis of indeterminate potential) 182
Coordinadores: Francesc Solé Ristol, Xavi Calvo González

Fundamentos y conceptos básicos. SMD y CHIP 184
David Steensma

La vida en un CHIP. CHIP y leucemias secundarias 185
Sara Álvarez de Andrés, Juan Cruz Cigudosa

Implicaciones clínicas y seguimiento de los pacientes con hematopoyesis clonal 189
Blanca Xicoy Cirici

Trasplante de progenitores hematopoyéticos y terapia celular 195
Coordinadores: Lucía López Corral, Carmen Martínez Muñoz

Selección de donantes para alotrasplante hematopoyético 197
Ildefonso Espigado

Challenges in the diagnosis, classification and assessment of response of chronic graft-*versus*-host disease in clinical practice 204
Mary E. D. Flowers, Paul J. Martin

Enfermedad del injerto contra el huésped. Nuevas herramientas terapéuticas 212
Pere Barba

Nuevos retos en el manejo de los pacientes con Leucemia Mieloide Crónica 213
Coordinadores: Valentín García Guitérrez, M.ª Teresa Gómez Casares

Chronic myeloid leukemia: the paradigm of targeting oncogenic tyrosine kinase signaling and counteracting resistance for successful cancer therapy 214
Simona Soverini, Luana Bavaro, Margherita Martelli, Sara de Santis, Cecilia Monaldi, Manuela Mancini

Nuevas estrategias terapéuticas en la discontinuación del tratamiento en la leucemia mieloide crónica 218
Fermín Sánchez-Guijo Martín

Las nuevas recomendaciones de la Red Europea de Leucemia sobre el diagnóstico, el seguimiento, la evaluación y el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (ELN2019) 222
Juan Luis Steegmann Olmedillas

XXXII LECCIÓN CONMEMORATIVA ANTONIO RAICHS

Coordinadores:

Dr. Jorge Sierra Gil. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona

Dr. José Antonio Pérez Simón. Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla

Estudio de la enfermedad mínima residual en hemopatías malignas. Métodos y aplicaciones

Marcos González Díaz

Centro de Investigación Biomédica en Red Cáncer (CIBERONC), Centro de Investigación del Cáncer (CIC), Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL). Servicio de Hematología, Hospital Universitario Salamanca

› Introducción

En la actualidad, las estrategias terapéuticas empleadas en el tratamiento de las leucemias y linfomas consiguen una elevada tasa de remisiones completas (RC), definida como la ausencia de células tumorales detectadas en médula ósea mediante técnicas citomorfológicas convencionales (límite de detección: 1-5% de células tumorales). Sin embargo, muchos pacientes van a recaer de su enfermedad debido a la existencia de un pequeño número de células malignas que no son detectadas con la metodología convencional, que es lo que se denomina enfermedad mínima residual (EMR)[1-6]. Debido a esto, los enfermos son sometidos indiscriminadamente a tratamientos de consolidación, incluido el trasplante de progenitores hematopoyéticos, para eliminar la EMR. Ello hace que algunos pacientes reciban más tratamiento del necesario, mientras que en otros es insuficiente. Por tanto, son necesarias técnicas más sensibles que permitan evaluar la masa residual de forma más precisa, lo que posibilitaría realizar tratamientos de consolidación adaptados a cada enfermo.

Los métodos empleados en la detección de la EMR se basan en técnicas de citometría de flujo multiparamétrica (CMF) y técnicas de biología molecular (estudio de reacción en cadena de la polimerasa –PCR– cuantitativa en tiempo real, principalmente), ya que ambas presentan las características esenciales de una técnica de EMR: cuantificación y sensibilidad de al menos 1×10^{-4} (1 célula tumoral en 10^4 células normales), especificidad, robustez metodológica –métodos estandarizados– y aplicabilidad[1-3]. Durante los últimos años se ha producido un gran avance en las metodologías de EMR tanto de CMF (aparición de las denominadas NGF –*next generation flow*–)[7] como moleculares (estudio de secuenciación masiva de nueva generación –NGS–, PCR digital, etc.)[8,9]. Asimismo, los estudios moleculares pueden aplicarse en otros tipos de muestras además de las celulares, como el empleo de la denominada "biopsia líquida" basada en la detección de diferentes componentes tumorales como ADN circulante tumoral (ADNct), ARN circulante tumoral (ARNct) o exosomas en plasma u otros fluidos biológicos. Esta muestra de ADNct es especialmente útil en aquellas neoplasias en las que la presencia de células tumorales circulantes es menor (por ejemplo, linfomas) o bien cuando la recidiva tumoral es extramedular (por ejemplo, plasmocitomas o tumores mieloides)[10].

En la actualidad hay numerosos estudios en diferentes enfermedades hematológicas que demuestran que existe una correlación entre la detección de la EMR y una menor supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG), lo que hace que estos estudios sean obligatorios para una adecuada monitorización terapéutica y además permiten guiar el tratamiento de consolidación, evitando que los pacientes sean infra- o sobretratados[1-6].

En este trabajo se revisarán los aspectos metodológicos de las diferentes técnicas, así como los resultados clínicos más relevantes en diferentes neoplasias hematológicas donde se utiliza la EMR en la toma de decisiones terapéuticas, por lo que su empleo es necesario en la buena práctica clínica.

› Aspectos metodológicos. Técnicas moleculares y de inmunofenotipo por citometría de flujo

Ambas metodologías con sus diferentes variantes tienen ventajas e inconvenientes específicos, que se deben conocer para aplicar la técnica más adecuada en cada caso de acuerdo principalmente con el tipo de enfermedad –por ejemplo, CMF en leucemia linfática crónica (LLC) y técnicas moleculares en leucemia

mieloblástica aguda (LMA) y linfoma de células del manto– y de laboriosidad y complejidad del análisis, que depende principalmente del marcador tumoral que se analice como diana tumoral de la EMR.

› *Técnicas moleculares*

› *Técnicas de PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR)*

Las 2 dianas tumorales empleadas con mayor frecuencia en los estudios de PCR cuantitativa son: i) los reordenamientos clonales de los genes de las inmunoglobulinas (Ig) y del receptor de célula T (RCT)[1]; y ii) las alteraciones cromosómicas en las que se conocen los oncogenes implicados que dan lugar a regiones quiméricas de fusión características de diferentes enfermedades (por ejemplo, *BCR/ABL1*, en la leucemia mieloide crónica –LMC–)[11]. Estos estudios se pueden realizar bien a partir de ADN, lo que facilita el manejo de las muestras al ser un material estable (estudios de reordenamientos clonales de Ig/RCT y algunas translocaciones cromosómicas, como *BCl-1/JH* o *BCL-2/JH* en los linfomas de células de manto y folicular, respectivamente), o bien a partir de ARN en las translocaciones cromosómicas en las que el punto de rotura es muy variable y no es posible su detección a nivel del ADN, pero en las que, si es intrónico el punto de rotura, la translocación da lugar a la generación de genes híbridos (por ejemplo, *BCR/ABL, PML/RAR*, etc.) que se encuentran en marco de lectura, lo que permite su detección a partir de ARN tras su transformación a cADN mediante técnica de transcriptasa inversa seguida de reacción de PCR (técnica de RT-PCR)[1,2,4-6].

Metodológicamente, la estrategia de los reordenamientos clonales linfoides B y T es más compleja, ya que precisa, para ser específica y suficientemente sensible (> 1×10^{-4}), la secuenciación de las regiones clonoespecíficas *V(D)J* de cada paciente y el posterior diseño de oligonucleótidos específicos de las regiones hipervariables CDRIII. Estos oligonucleótidos serán empleados en el estudio de la EMR bien como sondas clonoespecíficas o bien como primer alelo específico en una reacción de PCR (ASO-PCR)[1]. Otra limitación del empleo de este marcador es la presencia de mutaciones somáticas en los genes de Ig en los pacientes con síndromes linfoproliferativos crónicos (por ejemplo, linfoma folicular o mieloma múltiple –MM–), que dificulta la hibridación correcta de los *primers* consenso[4,6]. Por el contrario, en los estudios de las translocaciones cromosómicas leucémicas específicas solo se requiere realizar 1 o 2 reacciones de PCR (PCR anidada) empleando *primers* consenso para todos los pacientes. Sin embargo, la primera metodología es más específica (menor riesgo de falsos positivos por contaminación), ya que no es solo un marcador específico del tumor sino también específico del paciente, debido a que las secuencias *V(D)J* son propias de cada clon celular de cada paciente. La aplicabilidad de estos 2 marcadores es diferente; así, mientras que la mayoría de las proliferaciones linfoides agudas y crónicas tienen 1 o los 2 marcadores (reordenamiento clonotípico linfoide B o T en > 85% y/o translocaciones cromosómicas el 30-40% de los casos), en las neoplasias mieloides, a excepción de la LMC (presencia de *BCR/ABL1* en casi el 100% de los casos), solo el 30-40% posee translocaciones cromosómicas que puedan emplearse como marcador de estudio de EMR[5].

Esto hace que en las neoplasias mieloides se necesiten marcadores de EMR alternativos, como son: i) mutaciones tumorales específicas cuantificables (por ejemplo, mutaciones de *NMP1* en LMA); ii) la expresión de genes aberrantes o bien genes expresados de forma aberrante (hiper- o hipoexpresados) que tienen el inconveniente de que no son específicos, ya que células normales inmaduras pueden expresarlos (por ejemplo, expresión del gen WT1); o iii) técnicas de quimerismo hematopoyético realizadas en los enfermos que han recibido un alotrasplante en poblaciones celulares separadas (por ejemplo, células CD34+) para distinguir si son del donante (quimerismo completo) o bien del receptor (quimerismo mixto y posible recaída)[12] (Tabla 1). La principal limitación de los estudios de PCR cuantitativa es la laboriosidad y complejidad de la metodología, por lo que el resultado se puede demorar días (en el caso de los reordenamientos de Ig/RCT), y además exige la necesidad de contar con laboratorios especializados.

› *Técnicas de secuenciación masiva por NGS y otras metodologías*

La NGS (*next generation sequencing*) es aplicable tanto al estudio de mutaciones y/o translocaciones cromosómicas tumorales como de los reordenamientos clonales linfoides B y T, e, igualmente, puede emplearse en ADN celular o bien ADNct, y ha mostrado su utilidad tanto en neoplasias linfoides (inmaduras y maduras) como mieloides[4-6,8,12,13]. Además, permite el

Tabla 1. Enfermedad mínima residual (EMR) en hemopatías. Aplicabilidad de las dianas de estudio por técnicas de biología molecular (RQ-PCR, NGS, ddPCR)

Dianas tumorales	Neoplasias linfoides (LLA, LNH, etc.)	LMA[a]	LMC
Ig y RCT	90%	–	–
Translocaciones[b] (ADN, genes de fusión)	30-40%	30-40%	BCR/ABL (100%)

[a] **Otros marcadores:** Mutaciones: *NPM1*, *IDH1/2*, *RUNX1*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2*
Hiperexpresión: WT-1, PRAME
Quimerismo hematopoyético en alotrasplante

[b] **Translocaciones cromosómicas**
LLA-precursores B: *BCR/ABL*/t(9;22) –en adultos–, *ETV6/RUNX1*/t(12;21) –en niños–, *E2A/PBX1*/t(1;19), *MLL-AF4*/t(4;11) y otras alteraciones de *MLL* (11q23)
LLA–precursores T: *SIL/TAL1*, *HOX 11L2* (t(5;14))
SLP y LNH–B: *BCL2/JH*,/t(14;18), *BCL1/JH*/t(11;14), mutaciones: *MyD88* , *BRAF1*
LMA: *RUNX1–MTG8*–t(8;21)–, *CBFB–MYH11–inv(16)*/t(16;16)–, *PML–RARA*–t(15;17)
Otras: *MLLT3/MLL*–t(9;11)–, *DEK/NUP214*–t(6;9)–, *RPN1/EVI1–inv(3)*/t(3;3)–, *RBM15/MLK1*–t(1;22)–

estudio de mutaciones de genes complejos que no se pueden analizar por RQ-PCR (por ejemplo, *DNMT3A*, *IDH1/2*, *RUNX1*...). Sus principales inconvenientes son el coste, la complejidad del análisis bioinformático y la falta de estandarización. Sin embargo, la rápida incorporación de mejoras metodológicas, con el consiguiente ahorro económico, hace que estas técnicas estén implantándose en la rutina clínica. Más aún, en el caso de los reordenamientos clonales linfoides B, ya se dispone de plataformas comerciales estandarizadas (por ejemplo, LymphoSIGHT® Platform) que han sido comparadas con las técnicas convencionales de citometría y ASO-PCR mostrando una excelente correlación y utilidad clínica[8,14-16].

La técnica de PCR digital en gota pequeña –*droplet*– (ddPCR) presenta las ventajas sobre las técnicas de ASO-PCR de no precisar recta patrón y de cuantificación absoluta; sin embargo, todavía está en fase de validación clínica y precisa estandarización metodológica –por ejemplo, el programa del European Study Group on MRD detection in ALL (EuroMRD), grupo en el contexto de la European Scientific foundation for Laboratory Hemato Oncology (ESLHO)– antes de su incorporación a la clínica rutinaria[9].

El uso de la "biopsia líquida" como muestra de estudio para detectar ADNct en plasma, así como otros fluidos (orina, líquido cefalorraquídeo –LCR–, heces, líquido pleural...), es especialmente importante en aquellos tumores no leucémicos como linfomas agresivos, linfoma cerebral primario, plasmocitomas, etc., y tiene además la peculiaridad de representar la heterogeneidad clonal global de las diferentes localizaciones/infiltraciones del tumor y no solo de la muestra tumoral que se analiza en la biopsia/aspirado. Otras ventajas serían que, al poder obtener la muestra mediante un procedimiento mínimamente invasivo, permite su determinación más frecuente y también que puede emplearse mediante NGS y ddPCR para el estudio de reordenamientos linfoides clonales y de mutaciones/translocaciones tumorales[10]. Sin embargo, aún se necesita validación clínica y estandarización técnica, especialmente de las condiciones preanalíticas de recogida de la muestra; en este sentido, la tendencia actual es la obtención de la muestra en tubos especiales que aseguren que no haya contaminación con ADN celular, los denominados tubos *cell-free DNA/RNA BCT®* (*blood cell collection*) (Streck), que permiten el aislamiento de ADN/ARN libre de células de alta calidad[10,16].

› *Técnicas de citometría de flujo*

En comparación con las técnicas moleculares, sus principales ventajas son: i) su rapidez, ya que permite realizar el análisis en horas; ii) que realiza un análisis multiparamétrico sobre cada una de las poblaciones de la muestra; iii) que almacena los datos para posteriores análisis; y iv) que es aplicable en la mayoría de los casos, ya que con frecuencia las células neoplásicas presentan fenotipos aberrantes que pueden considerarse "marcadores leucémicos asociados", definidos por alguna de las siguientes características: expresión aberrante de antígenos (Ag) de línea (por ejemplo, Ag linfoides en LMA), asincronismos madurativos (por ejemplo, expresión de Ag maduros e inmaduros en una misma célula tumoral), Ag sobre- o infraexpresados, y la presencia de fenotipos ectópicos (por ejemplo, linfocitos B CD10+ en sangre periférica)[2,3,7,12,13,17].

Sin embargo, esta metodología presenta una serie de limitaciones, como son la ausencia de Ag tumorales específicos y la posibilidad de que se produzcan cambios fenotípicos asociados a cambios madurativos o la presencia de varios clones con fenotipo diferente durante el tratamiento y la evolución de los pacientes, lo que dificultaría la identificación de las células tumorales. Otro problema añadido es el empleo de terapia con anticuerpos monoclonales (por ejemplo, rituximab –anticuerpo monoclonal anti-CD20– en síndromes linfoproliferativos), que dificulta la detección de este Ag en las células tumorales, por lo que deben diseñarse nuevas combinaciones de marcadores para el seguimiento de estos pacientes. Además, las estrategias de CMF empleadas inicialmente tenían menos sensibilidad que las técnicas moleculares de PCR[3]. Sin embargo, las mejoras técnicas y metodológicas han permitido superar estas deficiencias.

Recientemente, el grupo EuroFlow[7,17], basado en el uso de más de 8 fluorocromos, ha introducido el concepto de *new-throughput* en citometría, denominado NGF en EMR, basado en: i) análisis multivariado que incluye combinaciones de nuevos monoclonales, que identifica de forma inequívoca las poblaciones celulares normales; y ii) la adquisición de > 5 × 10^6 células para obtener una población de > 40 células cuantificables a un nivel de EMR de 10^{-5}[7]. El desarrollo y la estandarización de las diferentes fases de este programa (equipos, procesamiento de muestras, combinaciones de monoclonales, adquisición, análisis, etc.) permite conseguir de forma robusta sensibilidad superior a 10^{-5}. Con la introducción de nuevos fluorocromos y el uso de citómetros de 4-6 láseres, es posible distinguir más de 15 colores de forma rutinaria, lo que sin duda contribuirá a mejorar la aplicabilidad y la especificidad de la NGF en EMR y podrá superar algunos de los inconvenientes de esta metodología, como: i) la identificación de los cambios inmunofenotípicos inducidos por el tratamiento; ii) la caracterización precisa de todos los subclones leucémicos con diferente expresión antigénica; y iii) aberraciones antigénicas en otras líneas celulares que impliquen que el tumor afecta a más de una línea hematopoyética.

› *Conclusiones de las metodologías de enfermedad mínima residual*

De cualquier forma, independientemente de la técnica que se elija (citometría y técnicas moleculares con sus variantes), un requisito imprescindible es que se empleen metodologías estandarizadas, lo que permite además que los resultados en diferentes laboratorios sean comparables, aspecto este básico en los estudios multicéntricos y cuando del resultado de la EMR se derive un cambio en la actitud terapéutica. En relación con las técnicas moleculares, los proyectos europeos de estandarización de detección de genes de fusión por PCR cualitativa (*Biomed 1*) o cuantitativa (Europe against cancer -EAC program-) y de los reordenamientos clonales de los genes de Ig y RCT (*Biomed-2* y *ESG-MRD-ALL*)[18-20], que últimamente se han agrupado bajo las siglas de la ESLHO[21], que a su vez incluye varios subprogramas de estudios (*Euroclonality*, *EuroNGS*, *EuroMRD*) y los estudios de estandarización en LMC (estudio *EUTOS*: *European treatment and outcome study*)[22], son ejemplos de los esfuerzos que se han realizado para estandarizar estos estudios. Igualmente, en el caso de la citometría existen diferentes iniciativas para la estandarización de la metodología (Clinical Cytometry Society, Clinical Laboratory Standards Institute, European Leukemia Net) y desarrollo de paneles de anticuerpos (EuroFlow Consortium)[17]. Sin duda, estos esfuerzos de estandarización permitirán armonizar todos los estudios de EMR y aportar guías para la interpretación correcta de sus resultados[4,6,7,12].

› Aplicaciones clínicas de los estudios de enfermedad mínima residual

En esta sección se revisarán, por enfermedades, las principales aportaciones de los estudios de EMR, haciendo especial hincapié en aquellas enfermedades donde su uso y su aplicación tienen implicaciones en la práctica clínica diaria. A destacar que, ante el valor pronóstico y predictivo de la EMR, la detección de la misma en la actualidad se ha extendido prácticamente a todas las hemopatías malignas agudas y crónicas.

Como consecuencia de esta importancia, los organismos reguladores de la Food and Drug Administration (FDA) y la European Medicines Agency (EMA), han propuesto guías para su aplicación en los ensayos clínicos y han establecido enfermedades (por ejemplo, LLC y MM) en las que el estudio de EMR se puede utilizar como un subrogado de algunos *endpoints* clínicos como la SLP o SG[23,24]. En este sentido, es destacable el incremento significativo y progresivo

del empleo del parámetro EMR como una variable de estudio en los ensayos clínicos[25].

En la **leucemia linfoblástica aguda**, los estudios de EMR por técnicas moleculares han mostrado, primero en series pediátricas y posteriormente confirmado en series de adultos, que son útiles en la predicción de la recaída, identificando grupos de enfermos con pronóstico diferente, siendo además el riesgo de recaída proporcional al nivel de EMR[1,26]. Estudios posteriores empleando técnicas de citometría de flujo han mostrado que ambas metodologías obtienen resultados similares, si bien la sensibilidad de la técnica de PCR es superior. Sin embargo, con la mejora en las técnicas de citometría, la sensibilidad en algunos estudios es similar[13].

En la mayoría de los análisis, el nivel de EMR es un factor pronóstico independiente, si bien su presencia se correlaciona con subtipos citogenéticos/moleculares y, en menor medida, con datos clínicos a la presentación. En consecuencia, los estudios de EMR en la actualidad constituyen una herramienta fundamental para identificar pacientes con un alto riesgo de recaída y, por tanto, subsidiarios de medidas terapéuticas diferentes (por ejemplo, cambio de régimen quimioterápico –incluido el empleo de trasplante de progenitores hematopoyéticos–, utilización de nuevas drogas o bien empleo preventivo de infusión de linfocitos en pacientes sometido a alotrasplante). Igualmente, estos estudios también identifican pacientes con bajo riesgo de recaída y, por tanto, que no deben recibir tratamientos intensivos innecesarios[13,15,26,27]. En este sentido, aunque no hay duda de que el estudio de la EMR es el factor más potente para predecir el riesgo de los pacientes, superando la información pronóstica obtenida al diagnóstico de los pacientes, aún existen algunas incógnitas a resolver, como conocer si las nuevas metodologías de EMR (NGS y ddPCR) mejoran las previas y cómo se incorpora esta información a la terapia adaptada al riesgo. Igualmente, se necesitan estudios para conocer la utilidad real de los estudios realizados en muestras alternativas a la médula ósea, como la sangre periférica y/o el ADNct[27].

En las **leucemias mieloblásticas agudas**, el marcador guía empleado como diana tumoral en la mayoría de los estudios de EMR ha sido el análisis mediante RT-PCR de las translocaciones cromosómicas más frecuentes[5,12] (Tabla 1). Estos estudios han mostrado la utilidad de la EMR para identificar pacientes con peor supervivencia y detectar de forma precoz la recaída molecular antes de que se produzca la recaída clínica, lo que permite aplicar tratamientos preventivos. Además, también han mostrado cómo la cinética de recaída es diferente según la translocación –más rápida en LMA t(15;17) que en inv(16) o t(8;21)[28,29]–. Sin embargo, estas translocaciones permiten el estudio en el 30-40% de todas las LMA, por lo que es necesario implementar otros marcadores, como mutaciones somáticas que sean cuantificables, como NPM1, que ha demostrado su valor en la estratificación de pacientes con diferente riesgo de recaída[30], o bien la expresión de genes que, o no son expresados en células hematopoyéticas normales (por ejemplo, el gen *PRAME*), o bien las células tumorales presentan hiperexpresión de los mismos (por ejemplo, el gen *WT1*), si bien su valor pronóstico/predictivo es inferior[5] (Tabla 1).

Más recientemente, la incorporación de los estudios de NGS y sus innovaciones metodológicas[12,31], así como la ddPCR[32], permiten aumentar de forma considerable el porcentaje de pacientes en los que se puede analizar la EMR, si bien esta metodología necesita validación clínica y presenta aún algunas limitaciones metodológicas (sin estandarización informática, menor sensibilidad de la mayoría de las plataformas empleadas y coste más elevado que la RQ-PCR)[33]. Otra información a tener en cuenta es que el estudio de los grupos HOVON/SAKK demuestra que las mutaciones preleucémicas (DTA: *DNMT3A*, *TET2* y *ASXL1*) pueden persistir tras el tratamiento sin que implique recaída del paciente[34]. Las técnicas de citometría de flujo también han demostrado ser útiles para identificar pacientes con diferente pronóstico, si bien los resultados son menos consistentes debido en parte a la dificultad de identificar de forma específica los blastos mieloides[3,35]. Sin duda, los esfuerzos de estandarización del grupo de EuroFlow[17] y las mejoras técnicas de la CMF aumentarán el valor predictivo de la CMF en LMA[12,33].

En la **LMC**, antes de la introducción de los inhibidores de la tirosina cinasa (ITK), el estudio de la EMR estaba restringido a los pacientes sometidos a alotrasplante, ya que en el resto de los pacientes la respuesta hematológica y citogenética era suficiente para evaluar a los enfermos[36]. Sin embargo, la alta eficacia del tratamiento actual con ITK consigue que la mayoría de los pacientes alcancen la respuesta citogenética, lo que obliga a disponer de métodos de

cuantificación más sensibles. La cuantificación del gen de fusión *BCR/ABL* mediante PCR cuantitativa en tiempo real ha demostrado en numerosos estudios que la cinética de disminución del tránscrito tumoral y el grado de respuesta alcanzada (respuesta molecular mayor y completa) se correlaciona con la SLP. Además, permite establecer criterios de respuesta clínica (no respuesta, subóptima y óptima) según el número de tránscritos detectados, lo que permite ajustar el tratamiento del paciente a su riesgo (aumento de dosis de ITK, necesidad de emplear ITK de segunda generación, indicar alotrasplante, etc.) y orientar la necesidad de llevar a cabo estudios biológicos (por ejemplo, realizar estudio de mutaciones de *ABL1* si existe un incremento de copias y elegir el tipo de ITK apropiado a la mutación detectada)[37,38].

En los **síndromes linfoproliferativos crónicos,** incluyendo linfomas del manto, folicular, LLC, tricoleucemia, macroglobulinemia de Waldenström y MM, diferentes estudios han mostrado el valor pronóstico del estudio de la EMR analizada por técnica de ASO-PCR[4,8,16,39-42]. Igualmente, las técnicas de citometría de flujo, cuando se emplean al menos 6-8 colores, han mostrado ser de utilidad principalmente en el linfoma del manto, la leucemia linfática cónica y el MM, considerándose ambas técnicas como complementarias[6,17,40,42,43], e incluso en la LLC, dado que la CMF es una técnica más simple y emplea una estrategia común y no específica del paciente como la ASO-PCR, se considera la técnica de elección[44].

Al igual que ocurre en otras hemopatías, las nuevas metodologías (NGF, NGS, ddPCR) han demostrado su utilidad y se pueden considerar como técnicas complementarias[4,8,14,16,44-47]. Sin embargo, pese a la evidente utilidad de la detección de la EMR, su determinación/implementación en la práctica rutinaria aún no está totalmente aceptada, si bien en la LLC y el MM su uso se ha planteado en los ensayos clínicos como subrogado de *endpoints* clínicos –SLP y SG– [6,23]. Una limitación de las técnicas de EMR cuando emplean como muestra de estudio la médula ósea es la distribución heterogénea de la infiltración de la médula y/o la presencia de enfermedad extramedular en el caso del MM, o la falta de infiltración medular en los linfomas no Hodgkin, por lo que en estos casos el empleo de técnicas de imagen (tomografía por emisión de positrones/tomografía computarizada –PET/TC–, resonancia magnética –RM–) y/o muestras de ADNct pueden ser de utilidad[4,6,10].

› Conclusiones

En la actualidad, la información proporcionada por los estudios de EMR en la mayoría de las hemopatías malignas constituye un factor pronóstico independiente, añadiendo valor a otros parámetros clínico-biológicos tanto en hemopatías agudas como crónicas. De hecho, los estudios de EMR que hace una década eran excepcionales (solo en hemopatías agudas) han pasado a ser un parámetro a analizar en la mayoría de las neoplasias hematológicas. Su valor en el seno de estudios clínicos controlados ha hecho que su resultado, realizado en diferentes momentos evolutivos, sea tenido en cuenta para la toma de decisiones terapéuticas en el diseño de los nuevos protocolos terapéuticos en determinadas enfermedades. Así, el nivel de EMR permite modular la intensidad y la duración del tratamiento, elegir el momento más adecuado para indicar un auto- o alotrasplante, así como aconsejar ciertos tratamientos que solo son eficaces cuando el nivel de EMR está por debajo de niveles clínicos. Igualmente, permite detectar de forma precoz la reaparición de células neoplásicas y así utilizar terapias preventivas que son más eficaces para controlar la enfermedad que cuando la enfermedad ha recaído de forma clínica. Otro aspecto de importancia práctica y que ya ha sido contemplado por las agencias reguladoras (FDA, EMA) es la utilización de la EMR como marcador subrogado de *endpoints* clínicos, ya que permite acortar el tiempo de incorporación de los nuevos fármacos a la práctica clínica, lo que es especialmente útil en hemopatías crónicas (por ejemplo, LLC y MM). Otro reto es cómo se incorporan las nuevas metodologías de estudio de la EMR (NGF, NGS, ddPCR) a la práctica clínica. Estas técnicas tienen además la importancia de poder caracterizar en profundidad las alteraciones moleculares y antigénicas de las células residuales, lo que permitirá poder seleccionar tratamientos diana específicos acordes a las alteraciones genómicas y plantear tratamientos preventivos. Sin embargo, estas metodologías necesitan aún estandarización metodológica y validación clínica. Por otra parte, en algunas hemopatías está aún por definir el valor de emplear como fuente de estudio muestras alternativas como la sangre periférica y el ADNct, así como la necesidad o no de utilizar varias técnicas de EMR (moleculares y CMF) y conocer la importancia de incluir técnicas de imagen (PET/TC, RM) como análisis complementarios. En resumen,

estos estudios, de manera óptima, deberían permitir, en un futuro próximo, individualizar el tratamiento de cada paciente y, así, continuar la terapéutica o modificarla en favor de otras alternativas, cuando se detecten células residuales, o suspender el tratamiento de mantenimiento con el fin de evitar toxicidad añadida, cuando la EMR sea indetectable.

› Bibliografía

1. Van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER, et al.; European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL). Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. Leukemia. 2007;21:604-11.
2. Béné MC, Kaeda JS. How and why minimal residual disease studies are necessary in leukemia: a review from WP10 and WP12 of the European LeukaemiaNet. Haematologica. 2009;94:1135-50.
3. Wood BL. Principles of Minimal Residual Disease. Detection for Hematopoietic Neoplasms by Flow Cytometry. Cytometry B Clin Cytom. 2016 Jan;90(1):47-53.
4. Herrera AF, Armand P. Minimal Residual Disease Assessment in Lymphoma: Methods and Applications. J Clin Oncol. 2017;35:3877-87.
5. Hourigan CS, Gale RP, Gormley NJ, Ossenkoppele GJ, Walter RB. Measurable residual disease testing in acute myeloid leukaemia. Leukemia. 2017;31:1482-90.
6. Kumar S, Paiva B, Anderson K, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment inmultiple myeloma. Lancet Oncol. 2016;17:e328-46.
7. Pedreira CE, Costa ES, Lecrevisse Q, van Dongen JJ, Orfao A; EuroFlow Consortium. Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. Trends Biotechnol. 2013;31:415-25.
8. Ladetto M, Brüggemann M, Monitillo L, Ferrero S, Pepin F, Drandi D, et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. Leukemia. 2014;28:1299-307.
9. Drandi D, Ferrero S, Ladetto M. Droplet Digital PCR for Minimal Residual Disease Detection in Mature Lymphoproliferative Disorders. Methods Mol Biol. 2018;1768:229-56.
10. Scherer F, Kurtz DM, Diehn M, Alizadeh AA. High-throughput sequencing for noninvasive disease detection in hematologic malignancies. Blood. 2017;130:440-5.
11. Nyvold CG. Critical methodological factors in diagnosing minimal residual disease in hematological malignancies using quantitative PCR. Expert Rev Mol Diagn. 2015;15:581-4.
12. 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 Leukemia Net MRD Working Party. Blood. 2018;131:1275-91.
13. Van Dongen JJ, van der Velden VH, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. Blood. 2015;125:3996-4009.
14. Martínez-López J, Lahuerta JJ, Pepin F, González M, Barrio S, Ayala R, et al. Prognostic value of deep sequencing method for minimal residual disease detection in multiple myeloma. Blood. 2014;123:3073-9.
15. Pulsipher MA, Carlson C, Langholz B, Wall DA, Schultz KR, Bunin N, et al. IgH-V(D)J NGS-MRD measurement pre- and early post-allotransplant defines very low- and very high-risk ALL patients. Blood. 2015 May 28;125(22):3501-8.
16. Dogliotti I, Drandi D, Genuardi E, Ferrero S. New Molecular Technologies for Minimal Residual Disease Evaluation in B-Cell Lymphoid Malignancies. J Clin Med. 2018;7(9):piiE288.
17. Van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, et al.; EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006- 018708). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Leukemia. 2012;26(9):1908-75.
18. Van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. Leukemia. 1999;13:1901-28.
19. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. Leukemia. 2003;17:2318-57.
20. Van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia. 2003;17:2257-317.
21. Brüggemann M, Kotrová M, Knecht H, Bartram J, Boudjogrha M, Bystry V, et al.; EuroClonality-NGS working group. Standardized next-generation sequencing of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations for MRD marker identification in acute lymphoblastic leukaemia; a EuroClonality-NGS validation study. Leukemia. 2019 Sep;33(9):2241-53.
22. Müller MC, Cross NC, Erben P, Schenk T, Hanfstein B, Ernst T, et al. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. Leukemia. 2009;23:1957-63.
23. FDA Guidance for Industry. Hematologic Malignancies: Regulatory Considerations for use of Minimal Residual Disease in Development of Drug and Biological Products for Treatment. FDA; October 2018. Disponible en: https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM623333.pdf.
24. EMA Guideline on the use of Minimal Residual Disease as a Clinical Endpoint in Multiple Myeloma Studies. EMA; July 2018. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-use-minimal-residual-disease-clinical-endpoint-multiple-myeloma-studies_en.pdf.

25. Gormley N, Bhatnagar V, Ehrlich LA, Kanapuru B, Lee HZ, McKee AE, et al. FDA Analysis of MRD Data in Hematologic Malignancy Applications, J Clin Oncol. 2017;35:2541.
26. Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, Pfeifer H, Dworzak M, Ottmann OG, et al.; European Working Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (EWALL); International Berlin-Frankfurt-Münster Study Group (I-BFM-SG). Standardized MRD quantification in European ALL trials: Proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18–20 September 2008. Leukemia. 2010 Mar;24(3):521-35.
27. Short NJ, Jabbour E, Albitar M, de Lima M, Gore L, Jorgensen J, et al. Recommendations for the assessment and management of measurable residual disease in adults with acute lymphoblastic leukemia: A consensus of North American experts. Am J Hematol. 2019;94:257-65.
28. Santamaría C, Chillón MC, Fernández C, Martín-Jiménez P, Balanzategui A, García Sanz R, et al. Using quantification of the PML-RARalpha transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia. Haematologica. 2007;92:315-22.
29. Ommen HB, Schnittger S, Jovanovic JV, Ommen IB, Hasle H, Østergaard M, et al. Strikingly different molecular relapse kinetics in NPM1c, PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, and CBFB-MYH11 acute myeloid leukemias. Blood. 2010;115:198-205.
30. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of minimal residual disease in standard-risk AML. N Engl J Med. 2016;374:422-33.
31. Onecha E, Linares M, Rapado I, Ruiz-Heredia Y, Martínez-Sánchez P, Cedena T, et al. A novel deep targeted sequencing method for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia. Haematologica. 2019;104:288-96.
32. Cilloni D, Petiti J, Rosso V, Andreani G, Dragani M, Fava C, Saglio G. Digital PCR in Myeloid Malignancies: Ready to Replace Quantitative PCR? Int J Mol Sci. 2019;20(9).
33. Short NJ, Ravandi F. How close are we to incorporating measurable residual disease into clinical practice for acute myeloid leukemia?. Haematologica. 2019;104:1532-41.
34. Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, Kavelaars FG, al Hinai A, Zeilemaker A, et al. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2018;378:1189-99.
35. Vidriales MB, Pérez-López E, Pegenaute C, Castellanos M, Pérez JJ, Chandía M, et al.; PETHEMA Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas Cooperative Study Group. Minimal residual disease evaluation by flow cytometry is a complementary tool to cytogenetics for treatment decisions in acute myeloid leukaemia. Leuk Res. 2016 Jan;40:1-9.
36. Hughes TP, Branford S. Monitoring disease response to tyrosine kinase inhibitor therapy in CML. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009:477-87.
37. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European Leukemia Net recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. Blood. 2013;122:872-84.
38. Cross NC, White HE, Colomer D, Ehrencrona H, Foroni L, Gottardi E, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2015;29:999-1003.
39. Pott C, Hoster E, Delfau-Larue MH, Beldjord K, Böttcher S, Asnafi V, et al. Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study. Blood. 2010;115:3215-23.
40. Bottcher S, Stilgenbauer S, Busch R, Brüggemann M, Raff T, Pott C, et al. Standardized MRD flow and ASO IGH RQ-PCR for MRD quantification in CLL patients after rituximab-containing immunochemotherapy: a comparative analysis. Leukemia. 2009 Nov;23(11):2007-17.
41. Sarasquete ME, García-Sanz R, González D, Martínez J, Mateo G, Martínez P, et al. Minimal residual disease monitoring in multiple myeloma: a comparison between allelic-specific oligonucleotide real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometry. Haematologica. 2005 Oct;90(10):1365-72.
42. Puig N, Sarasquete ME, Balanzategui A, Martínez J, Paiva B, García H, et al. Critical evaluation of ASO RQ-PCR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. Leukemia. 2014 Feb;28(2):391-7.
43. Lahuerta JJ, Paiva B, Vidriales MB, Cordón L, Cedena MT, Puig N, et al.; GEM (Grupo Español de Mieloma)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) Cooperative Study Group. Depth of Response in Multiple Myeloma: A Pooled Analysis of Three PETHEMA/GEM Clinical Trials. J Clin Oncol. 2017;35:2900-10.
44. Ghia P, Rawstron A. Minimal residual disease analysis in chronic lymphocytic leukemia: a way for achieving more personalized treatments. Leukemia. 2018;32:1307-16.
45. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, Puig N, García-Sánchez O, Böttcher S, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. Leukemia. 2017;31:2094-103.
46. Takamatsu H. Comparison of Minimal Residual Disease Detection by Multiparameter Flow Cytometry, ASO-qPCR, Droplet Digital PCR, and Deep Sequencing in Patients with Multiple Myeloma Who Underwent Autologous Stem Cell Transplantation. J Clin Med. 2017;6(10).
47. Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, Villamor N, Letestu R, Nomdedeu J, et al. A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. Leukemia. 2016;30:929-36.

ADN TUMORAL LIBRE CIRCULANTE EN EL DIAGNÓSTICO HEMATOLÓGICO

Coordinadores: **Dr. Joaquín Martínez López.** Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid
Dra. Blanca Ferrer Lores. Hospital Clínico Universitario de Valencia

Las biopsias tumorales han sido durante mucho tiempo la técnica de referencia para el correcto diagnóstico hematológico. En la era actual de la medicina de precisión, los análisis moleculares han adquirido una especial y creciente relevancia dado que revelan información adicional que ayuda tanto al diagnóstico como a guiar las estrategias terapéuticas.

Sin embargo las biopsias son invasivas y, según la localización de los tumores, pueden llegar a ser difíciles de realizar. Además, las biopsias repetidas, necesarias para poder detectar cambios en la enfermedad de un paciente a lo largo del tiempo y monitorizar su estado, son a menudo un método poco práctico. Finalmente, con esta metodología permitirá estudiar mejor la heterogeneidad tumoral, sobre todo en tumores como los hematológicos que suelen ser generalizados.

Desde hace una década, tanto el análisis del ADN tumoral libre circulante (ctADN) como de las células tumorales circulantes (CTC) en la sangre de pacientes con cáncer se ha definido con el término "biopsia líquida". Aunque inicialmente se ha desarrollado en tumores sólidos, cada vez más está adquiriendo una gran relevancia en neoplasias hematológicas. Además, su gran versatilidad de aplicación, así como la sencillez para la obtención de muestras para su estudio han permitido su rápido desarrollo.

La técnica proporciona nuevos conocimientos sobre la biología de la enfermedad tanto en el momento del diagnóstico como durante el tratamiento, permitiendo analizar la evolución del tumor, contribuyendo así de forma decisiva a la monitorización en tiempo real de la eficacia del tratamiento así como a la detección de los posibles mecanismos de resistencia.

A pesar de los notables avances realizados en los últimos años, los análisis mediante biopsia líquida todavía no se han implementado como prueba rutinaria en la práctica clínica. La justificación es el desafío técnico que supone el estudio en profundidad de ctADN y de CTC a muy bajas concentraciones en un entorno con millones de células circulantes. Para su identificación y caracterización se requieren métodos analíticos extremadamente sensibles y específicos y, además, hasta ahora, los resultados obtenidos con el análisis de biopsia líquida aún no proporcionan pautas validadas para el tratamiento y el manejo del paciente.

Sin embargo, los avances técnicos y los estudios clínicos cada vez son más alentadores y demuestran cómo la biopsia líquida es una técnica muy prometedora, que puede revolucionar el diagnóstico en un futuro cercano, siendo necesario estandarizar las técnicas de extracción y procesado de las muestras, así como realizar estudios comparativos multiplataforma.

En este simposio sobre la "DNA tumoral libre circulante en el diagnóstico hematológico" se tratarán los conocimientos acumulados y los últimos avances en este campo.

En la primera ponencia, la Dra. Beatriz Bellosillo tratará la "Importancia del estudio DNA libre circulante en el diagnóstico de los tumores hematológicos". Explicará el concepto global de la biopsia líquida centrándose en el ctADN que es el material más comúnmente analizado. Presentará con gran detalle las técnicas desarrolladas para su análisis, como son la PCR digital o tecnología BEAMing, así como los nuevos abordajes tecnológicos de la NGS como los UMIs que permiten aumentar su sensibilidad y, por tanto, su aplicación en el análisis del ctADN.

Posteriormente hará un recorrido histórico de las diferentes aplicaciones en las neoplasias hematológicas. Cómo se evidenció que niveles elevados de cfADN en ciertos linfomas se asocian a una mayor probabilidad de fallo a tratamiento y cómo la monitorización también permite identificar casos con mayor probabilidad de supervivencia libre de progresión, seguir mutaciones conocidas, detectar la aparición nuevas mutaciones o mecanismo de resistencia. Finalmente, se detendrá en la importancia de la hematopoyesis clonal a la hora de interpretar los resultados obtenidos

En la segunda ponencia, la Dra. Rosa Ayala profundizará en la utilidad de los "DNA tumoral libre circulante en leucemia". Presentará la experiencia existente hasta el momento tanto en LMA, SMD, LLC, LLA y LMC. Asimismo, discutirá sobre cómo el desarrollo de los diferentes métodos de detección de EMR en estas patologías han provocado una lenta aplicación de la biopsia líquida destacando, sin embargo, cómo puede ser una herramienta prometedora a falta de grandes trabajos que puedan evidenciar con más claridad su utilidad.

En la tercera ponencia, la Dra. Suzanne Trudel tratará la relevancia del estudio del "ADN libre circulante en el mieloma". Presentará evidencias del avance sustancial en la detección del perfil molecular de los pacientes y su aplicación más inmediata a la hora de escoger una terapia dirigida a la mutación. Explicará cómo el hecho de la utilidad para la monitorización no invasiva en tiempo real, así como la detección de la aparición de clones resistentes a fármacos puede favorecer su rápida aplicación y cómo con una sensibilidad mejorada, se puede prever su utilidad para el monitorización de la recaída temprana de la enfermedad y su potencial como detector de enfermedad mínima residual (EMR) en esta patología.

Importancia del estudio del ADN libre circulante en el diagnóstico de los tumores hematológicos

Beatriz Bellosillo
Departamento de Patología, Hospital del Mar/Parc de Salut Mar, Barcelona

La biopsia líquida ha supuesto un nuevo abordaje para el estudio del perfil molecular de los pacientes con cáncer. Se trata de una técnica diagnóstica mínimamente invasiva que permite capturar la heterogeneidad tumoral genómica intrapaciente. Al ser de fácil obtención, se está utilizando también a nivel investigacional para analizar la evolución clonal del tumor, así como la monitorización de la enfermedad (Siravegna *et al.,* Nat Rev Cancer. 2017).

La biopsia líquida incluye el análisis del ADN tumoral circulante (ctADN), células tumorales circulantes (CTC), exosomas (pequeñas vesículas liberadas por las células que contienen ADN, ARN y proteínas), ARN plaquetario y ARN tumoral circulante (ctARN). Estas determinaciones pueden realizarse en distintos fluidos, como plasma, líquido pleural, orina o líquido cefalorraquídeo, entre otros, aunque el más frecuentemente utilizado es el plasma sanguíneo (Wan *et al.*, Nat Rev Cancer. 2017).

El ctADN es el material más comúnmente analizado, ya que es más abundante que las CTC y, por tanto, más fácil de obtener y evaluar. El ctADN forma parte de la totalidad del ADN circulante (cfADN). Este se caracteriza por estar constituido por fragmentos de tamaño pequeño (170 pb), que son eliminados de la circulación en aproximadamente 2 horas. Los niveles de cfADN parecen tener valor pronóstico; así, niveles elevados se asocian a un peor pronóstico y a una menor supervivencia en la mayoría de los estudios publicados en los que se han estudiado diferentes tipos de tumores. Por otra parte, se ha reportado que, en general, las mutaciones detectadas en plasma se correlacionan bien con las mutaciones detectadas en el tumor, por lo que es un material útil para poder tener una visión global del perfil mutacional del tumor.

Una de las dificultades que presenta el análisis de ctADN es que se encuentra mezclado con cfADN procedente de células no tumorales que lo diluyen y, por tanto, pueden dificultar la detección de mutaciones y/u otras alteraciones si no se utilizan técnicas lo suficientemente sensibles. Las técnicas más recomendadas para el análisis de ctADN son la PCR digital o la tecnología BEAMing®, ya que permiten detectar mutaciones específicas con elevada sensibilidad (detección de mutación presente en entre un 0,01 y un 0,1%). Estas tecnologías presentan el inconveniente de que solo se puede determinar un número definido de mutaciones en un grupo reducido de genes de forma simultánea. La aplicación de la tecnología de secuenciación masiva que permite un estudio más amplio de genes no fue posible inicialmente por su limitada sensibilidad en la detección de mutaciones (presencia de alelo mutado > 5%) (Crombie y Armand, Curr Hematol Malig Rep. 2019). Más recientemente se han desarrollado abordajes tecnológicos que permiten marcar las moléculas de ADN mediante la incorporación de secuencias cortas de nucleótidos diferentes entre sí y que permiten cuantificar y diferenciar entre sí las moléculas de ADN iniciales. Estas secuencias reciben el nombre de *unique molecular identifiers* (UMI) y permiten discriminar los errores del proceso de secuenciación de mutaciones reales, lo que permite aumentar la sensibilidad de las técnicas de secuenciación masiva y detectar mutaciones presentes hasta en un 0,1%. Además del estudio del perfil mutacional, también es posible realizar el estudio del ctADN analizando el reordenamiento de los genes que codifican para las cadenas de las inmunoglobulinas (principalmente cadenas pesadas) en el caso de neoplasias linfoides (Herrera y Armand, J Clin Oncol. 2017).

› Aplicación de la biopsia líquida en neoplasias hematológicas

Los trabajos iniciales en los que se utilizaron muestras de plasma para el estudio de neoplasias hematológi-

cas son de 2003-2004 (Jilani *et al.,* Leukemia. 2003; Rogers *et al.,* Blood. 2004). En este trabajo se analizaba la presencia de ADN leucémico mediante el estudio de la pérdida de heterocigosidad en plasma y aspirados de medula ósea, y se observaba que el estudio en plasma podía detectar mejor el ADN procedente de la clona leucémica. Posteriormente, en 2009, se estudió la concentración de ADN circulante en pacientes con diferentes tipos de linfomas y se observó que los pacientes con linfoma difuso de célula B grande (LDCBG), linfoma de células del manto y linfoma de Hodgkin (LH) presentaban niveles de cfADN mayores que los pacientes con linfoma folicular o los donantes sanos. Además, en este estudio se reportó que los niveles elevados de cfADN en LDCBG y en LH se asociaban a una mayor probabilidad de fallo del tratamiento (Hohaus *et al.*, Ann Oncol. 2009).

Los estudios en plasma en pacientes con LH han permitido estudiar el perfil mutacional de esta entidad de forma muy paralela al estudio realizado a partir de ADN de células Reed-Sternberg microdisecadas, corroborando la fiabilidad del cfADN para estudiar el perfil mutacional del tumor (Spina *et al.,* Blood. 2018). Asimismo, la monitorización de la presencia de ADN tumoral en plasma permite identificar aquellos casos con una mayor probabilidad de supervivencia libre de progresión.

Hallazgos similares se han reportado para los pacientes con LDCBG. El estudio y la monitorización de la presencia de ctADN en función del análisis del clonotipo del reordenamiento del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas permite diferenciar aquellos casos que presentan menor tiempo a la progresión, basándose en la cuantificación del ctADN después de 3 ciclos de tratamiento (Roschewski *et al.*, Lancet Oncol. 2015). Por otra parte, se ha descrito una elevada correlación entre el perfil mutacional del paciente cuando este se analiza en biopsia tumoral y en ctADN (Rossi *et al.*, Blood. 2017). Asimismo, el estudio del ctADN permite, además de monitorizar mutaciones conocidas, detectar la aparición de mutaciones o mecanismos de resistencia.

El papel de la biopsia líquida en otras neoplasias hematológicas como mieloma múltiple o síndromes mielodisplásicos ha sido menos estudiado, pero existen algunos trabajos en los que se ha visto una buena correlación entre los resultados del análisis mutacional en plasma y en médula ósea, por lo que la biopsia líquida también podría constituir una alternativa válida para la caracterización mutacional en estas enfermedades (Manier *et al.,* Nat Commun. 2018; Yeh *et al.,* Blood. 2018).

Finalmente, es importante tener en consideración, a la hora de interpretar los resultados del análisis de mutaciones mediante biopsia líquida, el fenómeno de la hematopoyesis clonal (HC). La HC se define como la presencia de una expansión clonal de células hematopoyéticas portadoras de mutaciones somáticas que se detectan en sangre periférica sin que haya evidencia de una enfermedad hematológica, es decir, en individuos aparentemente sanos (Steensma *et al.,* 2015). La HC puede aparecer por procesos puramente estocásticos o mediante selección de clonas portadoras de determinadas mutaciones que están ligadas a cambios relacionados con la edad y la senescencia de células madre hematopoyéticas (Gale *et al.*, 1997; Silver y Jaiswal, 2019). El desarrollo de esta expansión clonal se asocia con la adquisición de mutaciones en genes que se suelen asociar con células leucémicas, como, por ejemplo: *DNMT3A*, *TET2*, *JAK2*, *SF3B1*, *ASXL1*, *TP53*, *CBL*, *GNB1*, *BCOR*, *U2AF1*, *CREBBP*, *CUX1*, *SRSF2*, *MLL2*, *SETD2*, *SETDB1*, *GNAS*, *PPM1D* y *BCORL1* (Steensma *et al.,* 2015). La presencia de mutaciones en estos genes debe interpretarse adecuadamente e integrarse en el contexto clínico del paciente.

En conclusión, la biopsia líquida puede constituir una estrategia complementaria al análisis molecular en tejido. Este tipo de abordaje permite analizar la heterogeneidad tumoral, es aplicable en el momento del diagnóstico, durante la monitorización y en la recaída/progresión del paciente, y es útil para monitorizar el perfil mutacional de una forma no invasiva. Sin embargo, la mayoría de los estudios disponibles hasta el momento se han realizado de forma investigacional y es necesaria una estandarización de la metodología para aplicarla adecuadamente en la práctica clínica.

› Bibliografía

- Crombie J, Armand P. The Emerging Role of Liquid Biopsies in Lymphoproliferative Disorders. Curr Hematol Malig Rep. 2019 Feb;14(1):11-21.
- Gale RE, Fielding AK, Harrison CN, Linch DC. Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of the elderly suggests stochastic clonal loss with age. Br J Haematol. 1997;98(3):512-9.
- Hattori K, Sakata-Yanagimoto M, Suehara Y, Yokoyama Y, Kato T, Kurita N, et al. Clinical significance of disease-specific MYD88 mutations in circulat-

ing DNA in primary central nervous system lymphoma. Cancer Sci. 2018 Jan;109(1):225-30.
- Herrera AF, Armand P. Minimal Residual Disease Assessment in Lymphoma: Methods and Applications. J Clin Oncol. 2017 Dec 1;35(34):3877-87.
- Hohaus S, Giachelia M, Massini G, Mansueto G, Vannata B, Bozzoli V, et al. Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. Ann Oncol. 2009 Aug;20(8):1408-13.
- Jilani I, Estey E, Manshuri T, Caligiuri M, Keating M, Giles F, et al. Better detection of FLT3 internal tandem duplication using peripheral blood plasma DNA. Leukemia. 2003 Jan;17(1):114-9.
- Manier S, Park J, Capelletti M, Bustoros M, Freeman SS, Ha G, Rhoades J, et al. Whole-exome sequencing of cell-free DNA and circulating tumor cells in multiple myeloma. Nat Commun. 2018 Apr 27;9(1):1691.
- Rogers A, Joe Y, Manshouri T, Dey A, Jilani I, Giles F, et al. Relative increase in leukemia-specific DNA in peripheral blood plasma from patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. Blood. 2004 Apr 1;103(7):2799-801.
- 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 B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. Lancet Oncol. 2015 May;16(5):541-9.
- 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 Apr 6;129(14):1947-57.
- Scherer F, Kurtz DM, Newman AM, Stehr H, Craig AF, Esfahani MS, et al. Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. Sci Transl Med. 2016 Nov 9;8(364):364ra155.
- Silver AJ, Jaiswal S. Clonal hematopoiesis: Pre-cancer PLUS. Adv Cancer Res. 2019;141:85-128.
- Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. Nat Rev Clin Oncol. 2017 Sep;14(9):531-48.
- Spina V, Bruscaggin 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 May 31;131(22):2413-25.
- Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, Ebert BL. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. Blood. 2015 Jul 2;126(1):9-16.
- Wan JCM, Massie C, García-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. Nat Rev Cancer. 2017 Apr;17(4):223-38.
- Yeh P, Dickinson M, Ftouni S, Hunter T, Sinha D, Wong SQ, et al. Molecular disease monitoring using circulating tumor DNA in myelodysplastic syndromes. Blood. 2017 Mar 23;129(12):1685-90.

ADN tumoral libre circulante en leucemia

Rosa Ayala

Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario 12 de Octubre, Imas12-Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Cáncer (CIBERONC), Universidad Complutense de Madrid

› Introducción

El análisis de las aberraciones genéticas asociadas al cáncer puede ser realizado mediante técnicas de biopsia líquida usando marcadores de ADN tumoral libre circulante, células tumorales circulantes (CTC) o exosomas.

Las moléculas de ADN tumoral libre (*cell free DNA* –cfDNA–) son fragmentos extracelulares de ADN que se encuentran en sangre periférica (SP) y otros fluidos corporales. En general, el cfDNA se encuentra en concentraciones muy bajas en SP (media: 30; rango: 10-100 ng/mL). Por el contrario, los niveles elevados de cfDNA están presentes en diversos procesos patológicos, por ejemplo, en inflamación, trauma, cirugía, ataque cardiaco, accidente cerebrovascular o enfermedades autoinmunes. Los niveles más altos de cfDNA se han encontrado en el cáncer, especialmente en las etapas avanzadas y las metástasis, donde los niveles de cfDNA alcanzaron hasta 1.000 ng/mL, lo que sugiere una correlación cuantitativa entre los niveles de cfDNA y la carga tumoral. Desafortunadamente, el nivel de cfDNA no es específico del cáncer y, por lo tanto, no es un marcador diagnóstico.

Fisiológicamente, las células muertas se eliminan por los macrófagos mediante fagocitosis. Los fragmentos de ADN liberados se degradan en aproximadamente 10-15 minutos por el hígado, el bazo y los riñones; por lo tanto, los niveles fisiológicos de cfDNA son bajos.

En condiciones patológicas, los niveles elevados de cfDNA son causados por la muerte celular masiva o por la eliminación insuficiente de los fragmentos de ADN por el hígado. Además, en el cáncer, el cfDNA se libera no solo de las células tumorales sino también de las células circundantes. El estudio de las aberraciones moleculares del tumor nos discrimina el cfDNA específico del tumor del cfDNA liberado por otras células, ya que el cfDNA específico del tumor puede suponer solo una pequeña proporción (< 1%) del total de cfDNA y su cantidad depende del tamaño del tumor, la ubicación, el estadio tumoral, el *turnover* celular y la respuesta al tratamiento. Se estima que los pacientes con un tumor de 100 g (aproximadamente 3×10^{10} células) liberan un 3,3% de ADN tumoral a la circulación diariamente.

Las CTC son células tumorales intactas que emigran desde el tumor primario y las metástasis al sistema circulatorio. El número de CTC presente en la SP es tan bajo como una CTC por 10^6-10^7 leucocitos por mL de sangre, con menos aún en los estadios tempranos del cáncer. La detección y el aislamiento de las CTC se consiguen mediante la utilización de antígenos de expresión y sus diferencias físicas con los leucocitos. Son una población muy dinámica, caracterizada por una gran heterogeneidad a nivel genético, transcriptómico, proteómico y metabolómico.

Los exosomas están constituidos por una bicapa lipídica que contiene proteínas transmembrana y otras proteínas, ARN no codificante, mARN y ADN de doble cadena y cadena única. Hay estudios que han encontrado que el ADN de doble cadena y el ARN contenidos en los exosomas nos pueden dar detalles acerca del estado mutacional de las células originarias del tumor, así como la arquitectura de los exosomas protege al ARN de la actividad de las ARNasas, y todo esto nos permite detalles más exactos de los rasgos del tumor primario. Pero su utilidad clínica se basa hasta el momento en pequeñas series y faltan estudios en grandes ensayos clínicos[1].

La relevancia de los estudios de biopsia líquida se ha reportado fundamentalmente en tumores sólidos y en linfomas, y en esta ponencia nos vamos a centrar fundamentalmente en estudios de biopsia líquida mediante la cuantificación de cfDNA.

Utilidad de la biopsia líquida en varios cánceres mediante el estudio de las siguientes mutaciones genéticas[2]:

1. Cáncer colorrectal. Genes: *KRAS*, *BRAF*, *TP53*, *APC*, *CEA*, *SEPT9*, *HER2*, *BRAC1*.
2. Cáncer de mama. Genes: *HER2*, *BRCA1*.
3. Cáncer de pulmón. Genes: *KRAS*, *EGFR*, *BRAF*, *ERBB2*, *PIK3CA*, *ALK*, *ROS1*, *RET*, *HER2*, *MET*.
4. Cáncer hepatocelular. Genes: *MET*, *CDK6*, *EGFR*, *MYC*, *BRAF*, *RAF1*, *FGFR1*, *CCNE1*, *PIK3CA*, *ERBB2/HER2*.
5. Cáncer gástrico. Genes: *MUC1*, *CK19*, *HER2*, *TERT*, *CEA*.

Hasta el momento, las **biopsias quirúrgicas** son consideradas el *gold standard* para el diagnóstico y la elección del tratamiento para enfermedades donde está involucrada la genética, como es el cáncer. Pero, en ocasiones, hay limitaciones inherentes a las mismas, como son: la limitada accesibilidad del tumor que incrementa el riesgo de resultados falsos negativos, la falta de información de la heterogeneidad temporal y espacial, el panorama genético del tumor puede cambiar debido a la emergencia de subclones resistentes al tratamiento, complicaciones técnicas y de logística que llevan a falsos positivos, riesgo de efectos adversos en el paciente por el procedimiento de biopsia y un coste económico alto. En cuanto a las desventajas de la **biopsia líquida**, son: falta de estandarización de la técnica, falta de validación técnica y clínica necesarias para la implementación en la rutina clínica y, en algunos subtipos de cáncer, el diagnóstico y el subtipo no pueden ser establecidos por biopsia líquida y solo se pueden realizar por histología.

Aspectos técnicos relevantes en los estudios de biopsia líquida[3] son: el límite de detección para el análisis de cfDNA. La capacidad de detectar moléculas de cfDNA depende del total de ADN incorporado. Se han publicado varios métodos ultrasensibles con una capacidad de detección < 0,1%. Pero para utilizar esta capacidad de sensibilidad es necesario obtener un mínimo de 3,6 ng de cfDNA, asumiendo que una molécula de cfDNA es necesaria para su detección. Aunque, en la práctica, es necesaria más cantidad de cfDNA porque puede haber ADN no amplificable. También hay publicaciones que revisan aspectos importantes en los estudios de biopsia líquida, como es la optimización de todas las condiciones preanalíticas (Tabla 1) y de la importancia de los diferentes tubos con solución preservante de sangre periférica completa[3]. Dentro de la lista de tubos de recolección de sangre con reactivo de estabilización del cfDNA, los más reportados en publicaciones son los siguientes: Cell-free DNA BCT® (Streck, Omaha, USA) de 10 mL, PAXgene® Blood ccfDNA (PreAnalytiX Gmbh, Switzerland) de 10 mL y cfD® (Roche Diagnostic, Basel, Switzerland) de 8,5 mL.

› Objetivo de la ponencia

La utilidad de la biopsia líquida en leucemias, agudas o crónicas, no ha tenido hasta el momento ese interés que está tenido en tumores sólidos o linfomas. Esto se debe a que en este tipo de tumores líquidos ya se lleva trabajando mucho tiempo en cuantificar la carga tumoral tras el tratamiento mediante estudios de enfermedad mínima residual (EMR).

El objetivo de esta ponencia es revisar los trabajos que existen y compararlos con los estudios de EMR y de CTC. Y también establecer las perspectivas que vemos a los estudios de biopsia líquida tras esta revisión.

› Resumen de trabajos

› *Experiencia en ADN tumoral libre circulante en leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfática crónica (LLC) y leucemia linfoblástica aguda (LLA)*

De forma similar a otros tipos de cáncer, en LMA también se han encontrado niveles elevados de cfDNA[4]. El primer estudio que evalúa el perfil mutacional mediante cfDNA en tumores hematológicos se realizó en pacientes con **LMA** y síndrome mielodisplásico (SMD). Rogers *et al.* mostraron cómo la SP de pacientes con LMA/SMD está enriquecida de ADN tumoral circulante[5].

También, se ha identificado la presencia de fragmentos nucleosomales circulantes como predictores de la respuesta al tratamiento en pacientes con LMA[6]. Se trata de un estudio pequeño de 25 pacientes con LMA en tratamiento de inducción, independientemente del estado real de remisión que lograron, en el que demostraron que todos los pacientes mostraban una eventual caída del ADN nucleosomal circulante, pero aquellos pacientes que iban a lograr una remisión completa presentaban una elevación inicial en los

Tabla 1. Factores preanalíticos que influyen en los resultados del análisis del ADN tumoral libre (cfDNA)

Etapa preanalítica que afecta al cfDNA	Problema detectado	Recomendaciones	Referencias
Tubo de recogida	Liberación *ex vivo* ADN genómico de los leucocitos, inhibición de la PCR	Uso de tubo con estabilización del cfDNA	CEN/TS 16835-3:2015
		Uso de EDTA, en el caso de no tener tubo con estabilizante de cfDNA	Lam NY. Clin Chem. 2004
Tiempo desde la extracción hasta el procesamiento del plasma	Liberación *ex vivo* ADN genómico de los leucocitos	Debe ser verificado y validado en combinación con otras aplicaciones descritas posteriormente	Messaoudi SE. Clin Chim Acta. 2013
		Si se usa tubo de EDTA, procesarlo entre las 2 y las 6 horas tras la extracción	Chan KC. Clin Chem. 2005
Plasma o suero	Liberación *ex vivo* ADN genómico de los leucocitos	Uso de plasma	CEN/TS 16835-3:2015
			Lee CH. Transfusaion. 2001
Protocolo de procesamiento de plasma	Separación incompleta de la fracción celular	Para tubo en EDTA, usar una doble centrifugación, una con velocidad lenta y otra rápida	CEN/TS 16835-3:2015
	Lisis mecánica de las células de la sangre	En el caso de tubo estabilizante, seguir las recomendaciones indicadas por el fabricante	Messaoudi SE. Clin Chim Acta. 2013
Conservación del plasma	Reducción del aprovechamiento, incremento de la fragmentación	No conservar el plasma a 2-8 °C más de 24 horas. Congelar a –20 °C o –80 °C	Messaoudi SE. Clin Chim Acta. 2013
		Evitar repetir ciclos de congelación/descongelación	CEN/TS 16835-3:2015
Purificación del ADN	Compatibilidad subóptima con el tubo de recolección	Validación y verificación del método de purificación del ADN	Fleischhacker M. Clin Chim Acta. 2011
	Rendimiento bajo debido a la pérdida de ADN, sesgo por la longitud del cfDNA aislado	Empleo de un sistema integrado kit-tubo. Seguir las recomendaciones del fabricante	CEN/TS 16835-3:2015
Cuantificación del ADN	Sobrecuantificación debido a impurezas y al límite de detección del espectrofotómetro	Usar métodos de cuantificación de qPCR	Devonshire AS. Anal Bioanal Chem. 2014
			CEN/TS 16835-3:2015
Almacén del ADN	Reducción del aprovechamiento	Almacén del cfDNA a –20 °C o inferior	CEN/TS 16835-3:2015
	Incremento de la fragmentación	Evitar ciclos de congelación y descongelación	Chan KC. Clin Chem. 2005

días 2 a 4 tras el tratamiento de inducción, posiblemente como reflejo del incremento de apoptosis en respuesta al tratamiento.

El grupo australiano de Sarah-Jane Dawson[7] en SMD evidencia la capacidad de predecir el fallo al tratamiento en el seguimiento de la enfermedad mediante la detección de mutaciones *driver* y alteraciones citogenéticas en ADN circulante tumoral. El estudio se basa en un análisis seriado de 75 muestras pareadas de médula ósea (MO) y de plasma en 12 pacientes, y demuestra que el cfDNA es directamente comparable a la biopsia de MO en la representación de la heterogeneidad genómica de los clones tumorales en SMD.

También hay estudios donde cuantifican la mutación de *NPM1* en cfDNA de plasma de los pacientes con LMA y obtienen unos resultados comparables a la detección de *NPM1* mutado en MO, aunque este estudio tiene la limitación de que no compara en paralelo el resultado de ambos especímenes[8]. La mutación de *NPM1* fue identificada en 37 de 100 pacientes usando cfDNA de plasma, pero solo en 35 usando células de SP.

En **LMC** no hay publicaciones de biopsia líquida.

En **LLA**, se han estudiado los niveles de cfDNA totales en SP de pacientes pediátricos con LLA al diagnóstico (21 casos con LLA, 12 donantes sanos y 13 pacientes con otros tumores) en un total de 182 muestras (LLA = 152, donantes = 12, otros tumores = 20). Encuentran que los niveles de cfDNA en muestras de LLA al diagnóstico (277 ng/mL) y en el día 3 de tratamiento (248 ng/mL) estaban elevados significativamente en relación con las muestras de donantes sanos (57 ng/mL) y con otros tumores (76 ng/mL). Interesantemente, tras 4 días de tratamiento, los niveles de cfDNA en

SP cayeron a niveles normales (62 ng/mL). Esta reducción se correlacionó con la caída de la cifra de leucocitos en SP. La detección temprana de EMR fue llevada a cabo en cfDNA de plasma y de ADN de leucocitos, mostrando una concordancia alta entre ambas (86,7%). Estos resultados sugieren que el análisis de cfDNA para EMR en LLA puede tener gran utilidad durante las fases tempranas del tratamiento[9]. Frickhofen *et al.* analizan el reordenamiento de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IGH) en muestras de cfDNA de 110 pacientes con LLA y linfoma no Hodgkin (LNH). Detectan reordenamiento clonal de IGH en el 54% de los pacientes. Además, detectan que el tratamiento modifica los niveles de cfDNA derivado del tumor[10].

En **LLC** hay un trabajo importante del grupo de Sarah-Jane Dawson[11] que demuestra que el estudio del cfDNA refleja los cambios en los diferentes compartimentos de la enfermedad tras el tratamiento con las nuevas drogas. El análisis de cfDNA seriado permite monitorizar la dinámica clonal a lo largo del tiempo e identifica la aparición de cambios genómicos asociados con el síndrome de Richter (RS). Junto a la monitorización convencional de la enfermedad, el cfDNA ofrece una oportunidad única para el análisis seriado no invasivo de la LLC mediante la monitorización molecular de la clona tumoral. Y también hay un trabajo de **A. Albitar**[12] donde, con métodos de secuenciación ultrasensibles para detección de mutaciones en *BTK* y *PLCγ2* en ADN celular y en cfDNA, lo correlacionan con la progresión en pacientes tratados con inhibidores de *BTK*. El método ultrasensible detecta clones mutantes en un 37,5% de las muestras. Y demuestran que, sin el método ultrasensible, un 56% de las mutaciones de *BTK* y un 85% de *PLCγ2* podrían no haber sido detectadas. También encuentran que el cfDNA obtenido del plasma es más exacto que el ADN celular en la detección de las mutaciones.

Este mismo autor[13] publica en anemia aplásica un estudio en 96 pacientes comparando MO y cfDNA en SP, e identifica en 33 (34%) una o más mutaciones tanto en cfDNA como en ADN de MO. De las 120 muestras, 48 (40%) mostraron una o más mutaciones en los siguientes genes: *ASXL1*, *BCOR*, *BCORL1*, *CBLC*, *CSF3R*, *DNMT3A*, *EZH2*, *IDH1*, *JAK2*, *NPM1*, *NRAS*, *PTEN*, *PTPN11*, *RUNX1*, *SETBP1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *TET2*, *U2AF1* y *ZRSR2*. Encontraron una excelente correlación (r^2 = 0,84; p < 0,0001) entre la frecuencia alélica de las variantes (VAF) de las mutaciones en MO y en cfDNA en los diferentes momentos (n = 75), lo que muestra una gran correlación entre ambos compartimentos.

› *Enfermedad mínima residual en leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia linfática crónica y leucemia linfoblástica aguda*

La EMR se define como la presencia de células leucémicas por debajo del límite de detección de los métodos convencionales morfológicos. Así, las técnicas más empleadas son la citometría de flujo (CMF) en MO o SP, y los métodos moleculares en ADN o ARN leucocitario de MO o SP.

La cuantificación de EMR en LMC y LLA está ampliamente aceptada e incorporada a los protocolos clínicos (por ejemplo, las guías de la European Leukemia Net –ELN– y de la National Comprehensive Cancer Network –NCCN–). En el caso de la LMC, la técnica de elección es la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) en ARN leucocitario obtenido de SP. En LLA Ph–, las guías NCCN recomiendan el seguimiento de los pacientes en MO, con evaluación morfológica, por citometría o por qPCR de la MO. Trabajos que validan la EMR incluyen el publicado por Ribera[14] y trabajos que validan el empleo de EMR por secuenciación de nueva generación (NGS) son el de Kotrova[15], el de Pulsipher[16] o los recogidos en la revisión de Sánchez[17]. Siempre en ADN leucocitario de MO.

La cuantificación de la EMR en LMA también se ha ido incorporando a los protocolos clínicos; así, la CMF y las técnicas de qPCR han sido clásicamente los métodos de elección en MO. Recientemente, el último protocolo PETHEMA incorpora la evaluación en SP en los casos con *NPM1* mutado o con reordenamientos *RUNX1-RUNX1T1* o *CBFb/Myh11*. También hay trabajos que han validado el empleo de NGS en la determinación de la EMR[18-20].

En la LLC, la cuantificación de EMR se está empezando a incorporar recientemente y hay algunas publicaciones que avalan su impacto, como el metaanálisis realizado por Montserrat[21]. Sin embargo, en guías clínicas como la de la NCCN solo está recomendado el seguimiento del recuento leucocitario y la revaluación morfológica de la MO, y el empleo de métodos de EMR en ensayos clínicos. Rawstron y el grupo ERIC han publicado recientemente el poder de la combinación de las técnicas de CMF y NGS en la determinación de la EMR en LLC[22].

› *Comparación de ADN tumoral libre* vs. *células circulantes tumorales* vs. *enfermedad mínima residual en leucemia*

En leucemias se lleva mucho tiempo trabajando en la detección de la carga tumoral presente en SP, dado que el tumor se encuentra principalmente circulando por la misma. Pero siempre en términos de EMR, ya que nuestro objetivo principal ha sido la detección de esa célula tumoral dentro del global de leucocitos presentes. Por ello, no hay demasiado publicado sobre cfDNA circulante en plasma, no asociado al leucocitario. Ni tampoco sobre CTC, definido como el estudio específico de la célula tumoral separada por métodos de CMF o inmunomagnéticos. Pero, probablemente, el estudio del tumor mediante cfDNA nos puede ofrecer otros aspectos no recogidos por la EMR en ADN leucocitario, dándonos una imagen más real de la arquitectura tumoral.

› Conclusiones

La detección del tumor en cfDNA circulante no ha sido incorporada hasta el momento como una herramienta útil en leucemias en guías o protocolos clínicos. Pero esto es principalmente debido a la falta de grandes trabajos que puedan evidenciar la utilidad en leucemias de esta herramienta prometedora de detección del cáncer.

Aun así, puede haber situaciones donde el estudio de ADN libre circulante ya se ha visto que puede tener gran utilidad: sarcomas granulocíticos, transformación Richter de LLC, SMD o anemia aplásica, etc.

Y, además, los trabajos presentes nos ponen en alerta de la gran capacidad de esta herramienta en el estudio del tumor de una forma global, también en leucemias.

› Bibliografía

1. Kubaczkova V, Vrabel D, Sedlarikova L, Besse L, Sevcikova S. Cell-free DNA - Minimally invasive marker of hematological malignancies. Eur J Haematol. 2017 Oct;99(4):291-9.
2. Mathai RA, Vidya RVS, Reddy BS, Thomas L, Udupa K, Kolesar J, et al. Potential Utility of Liquid Biopsy as a Diagnostic and Prognostic Tool for the Assessment of Solid Tumors: Implications in the Precision Oncology. J Clin Med. 2019 Mar 18;8(3).
3. Grolz D, Hauch S, Schlumpberger M, Guenther K, Voss T, Sprenger-Haussels M, et al. Liquid Biopsy Preservation Solutions for Standardized Pre-Analytical Workflows-Venous Whole Blood and Plasma. Curr Pathobiol Rep. 2018;6(4):275-86.
4. Gao YJ, He YJ, Yang ZL, Shao HY, Zuo Y, Bai Y, et al. Increased integrity of circulating cell-free DNA in plasma of patients with acute leukemia. Clin Chem Lab Med. 2010 Nov;48(11):1651-6.
5. Rogers A, Joe Y, Manshouri T, Dey A, Jilani I, Giles F, et al. Relative increase in leukemia-specific DNA in peripheral blood plasma from patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. Blood. 2004 Apr 1;103(7):2799-801.
6. Mueller S, Holdenrieder S, Stieber P, Haferlach T, Schalhorn A, Braess J, et al. Early prediction of therapy response in patients with acute myeloid leukemia by nucleosomal DNA fragments. BMC Cancer. 2006 May 30;6:143.
7. Yeh P, Dickinson M, Ftouni S, Hunter T, Sinha D, Wong SQ, et al. Molecular disease monitoring using circulating tumor DNA in myelodysplastic syndromes. Blood. 2017 Mar 23;129(12):1685-90.
8. Quan J, Gao YJ, Yang ZL, Chen H, Xian JR, Zhang SS, et al. Quantitative detection of circulating nucleophosmin mutations DNA in the plasma of patients with acute myeloid leukemia. Int J Med Sci. 2015;12(1):17-22.
9. Schwarz AK, Stanulla M, Cario G, Flohr T, Sutton R, Moricke A, et al. Quantification of free total plasma DNA and minimal residual disease detection in the plasma of children with acute lymphoblastic leukemia. Ann Hematol. 2009 Sep;88(9):897-905.
10. Frickhofen N, Muller E, Sandherr M, Binder T, Bangerter M, Wiest C, et al. Rearranged Ig heavy chain DNA is detectable in cell-free blood samples of patients with B-cell neoplasia. Blood. 1997 Dec 15;90(12):4953-60.
11. Yeh P, Hunter T, Sinha D, Ftouni S, Wallach E, Jiang D, et al. Circulating tumour DNA reflects treatment response and clonal evolution in chronic lymphocytic leukaemia. Nat Commun. 2017 Mar 17;8:14756.
12. Albitar A, Ma W, DeDios I, Estella J, Ahn I, Farooqui M, et al. Using high-sensitivity sequencing for the detection of mutations in BTK and PLCgamma2 genes in cellular and cell-free DNA and correlation with progression in patients treated with BTK inhibitors. Oncotarget. 2017 Mar 14;8(11):17936-44.
13. Albitar A, Townsley D, Ma W, De Dios I, Funari V, Young NS, et al. Prevalence of somatic mutations in patients with aplastic anemia using peripheral blood cfDNA as compared with BM. Leukemia. 2017 Jan;32(1):227-9.
14. Ribera JM, Oriol A, Morgades M, Montesinos P, Sarra J, González-Campos J, et al. Treatment of high-risk Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in adolescents and adults according to early cytologic response and minimal residual disease after consolidation assessed by flow cytometry: final results of the PETHEMA ALL-AR-03 trial. J Clin Oncol. 2014 May 20;32(15):1595-604.
15. Kotrova M, van der Velden VHJ, van Dongen JJM, Formankova R, Sedlacek P, Bruggemann M, et al. Next-generation sequencing indicates false-positive MRD results and better predicts prognosis after SCT in patients with childhood ALL. Bone Marrow Transplant. 2017 Jul;52(7):962-8.
16. Pulsipher MA, Carlson C, Langholz B, Wall DA, Schultz KR, Bunin N, et al. IgH-V(D)J NGS-MRD measurement pre- and early post-allotransplant defines very low- and very high-risk ALL patients. Blood. 2015 May 28;125(22):3501-8.

17. Sánchez R, Ayala R, Martínez-López J. Minimal Residual Disease Monitoring with Next-Generation Sequencing Methodologies in Hematological Malignancies. Int J Mol Sci. 2019 Jun 10;20(11).
18. Dillon LW, Hayati S, Roloff GW, Tunc I, Pirooznia M, Mitrofanova A, et al. Targeted RNA-sequencing for the quantification of measurable residual disease in acute myeloid leukemia. Haematologica. 2019 Feb;104(2):297-304.
19. Onecha E, Linares M, Rapado I, Ruiz-Heredia Y, Martínez-Sánchez P, Cedena T, et al. A novel deep targeted sequencing method for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia. Haematologica. 2019 Feb;104(2):288-96.
20. Thol F, Gabdoulline R, Liebich A, Klement P, Schiller J, Kandziora C, et al. Measurable residual disease monitoring by NGS before allogeneic hematopoietic cell transplantation in AML. Blood. 2018 Oct 18;132(16):1703-13.
21. Molica S, Giannarelli D, Montserrat E. Minimal Residual Disease and Survival Outcomes in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia: a Systematic Review and Meta-analysis. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2019 Jul;19(7):423-30.
22. Kwok M, Rawstron AC, Varghese A, Evans PA, O'Connor SJ, Doughty C, et al. Minimal residual disease is an independent predictor for 10-year survival in CLL. Blood. 2019 Dec 15;128(24):2770-3.

Circulating tumor DNA in diagnostic hematology: "case study" of multiple myeloma

Suzanne Trudel, Trevor J. Pugh
Department of Medical Oncology and Hematology, Princess Margaret Cancer Centre, Toronto, ON, Canada

› The need for advanced molecular monitoring methods for multiple myeloma

Multiple myeloma (MM) is characterized by recurrent cytogenetic and molecular abnormalities that have the potential to profoundly impact therapeutic decisions. Conventional karyotyping and/or FISH cytogenetics studies have identified translocations and copy number abnormalities (CNAs) that predict clinical outcomes[1]. More recently, MM whole-exome or genome sequencing (WES/WGS) studies have uncovered recurrent mutations in genes associated with prognosis and others that are potentially actionable and/or implicated in drug resistance. Although most mutations in genes, with the exception of *KRAS* and *NRAS*, occur at low frequency, approximately 60% of relapsed MM have potentionally actionable genomic alterations (eg., *BRAF*, FGFR3, CCDN1, IDH1 and IDH2)[2,3]. This has led to the initiation of umbrella clinical trials in MM exploring therapeutic exploitation of these mutations with targeted therapies (clinicaltrials.gov NCT03732703). Further, recent genomic studies have identified clinically relevant mutations that can stratify immunomodulatory drugs (IMiD) treated patients into poor risk (*CCND1*, *TP53*, *ATM*, *ATR* and *ZNFHX4*) or good risk (*IFR4* and *EGR1)* groups[4]. Finally, mutations in genes that can potentially influence response to IMiDs (*CRBN*, *CUL4B*, *IRF4*, *IKZF1*) or proteosome inhibitors (*XBP1*, *PSMB8*, *PSMD1*) have been reported in relapsed MM[5,6]. These observations highlight the need for advanced genomic platforms to inform prognosis and therapeutic decisions.

Currently molecular profiling of MM is performed on bone marrow (BM) aspirates however, the genetic information obtained from aspirates is confounded by spatial and temporal intratumour genetic heterogeneity. Genomic studies of MM have confirmed the bias introduced by single site biopsies, demonstrating that not all mutations are shared between targeted-biopsies of extramedullary sites and BM[7,8]. Further, longitudinal whole-genome sequencing studies have not only uncovered tumour heterogeneity at diagnosis but also subclonal competition with a shifting dominance of tumour clones and accumulation of genetic events during progression that are particularly affected by therapeutic pressures[9,10]. Thus, information acquired from a single biopsy provides a spatially and temporally limited snap-shot of a tumour that likely underestimates the complexity of the tumour genomic landscape. Genetic analysis of circulating tumor DNA (ctDNA) in blood plasma has the potential to overcome these barriers providing access to the genetic landscape of all cancerous lesions and allowing for non-invasive tracking of genomic evolution.

Thus MM serves as an excellent model for the application of cell free DNA (cfDNA) analysis given the diversity of genomic alterations and the spatial and temporal heterogeneity of the disease.

› Is cell free DNA sequencing feasible in multiple myeloma?

cfDNA that is shed into the bloodstream from healthy, inflamed or tumor cells undergoing apoptosis or necrosis has the attribute of ease of collection. Discriminating ctDNA from normal cfDNA is aided by the presence of genomic abnormalities that define tumor DNA. However, a major technical challenge in the analysis of cfDNA is low fraction of tumor-derived DNA present in plasma. Indeed studies from Jens Lohr's group, where tumor fraction was estimated by low-pass WGS (lpWGS) of cfDNA, established that only 75% of newly diagnosed and 62% of relapsed MM have tumor fraction of over 5% in blood[11]. Using

a binomial sampling model, we modeled the relationship between the potential risk of allele dropout and the amount of cfDNA used for sequencing and found that to have a 99.99% chance of capturing a tumour fragment at 0.0005 allele fraction (AF), 83 ng of cfDNA is required[12]. Given the high inter-patient variability in cfDNA yield (range 4.7-331 ng/mL of plasma) derived from MM patients in our laboratory[12], we are collecting approximately 40 mL of whole blood to optimize sampling of tumour DNA. Further, highly sensitive techniques are necessary for reliable detection of the tumor-derived fraction. Digital PCR (dPCR) or next generation sequencing (NGS) platforms have improved on the level of AF detection from 5%, derived by clinical laboratory methodologies, to thresholds of detection between 0.01 and 0.1% that allows for detection of mutations in rare plasma derived tumour fragments. Ultimately, the depth of detection is limited by sequencer and polymerase errors which can be mitigated to some degree by duplex sequencing and molecular barcoding.

In a pilot study of 64 plasma samples collected from 11 newly diagnosed and 42 relapsed patients we detected higher cfDNA yields in this MM cohort compared to 56 advanced solid tumor patients (median 20.1 *versus* 10.3 ng/mL plasma; $p < 0.001$)[12]. Concentrations of cfDNA in MM patients were independent of the ISS, but correlated with advanced disease (late relapse *versus* early relapse; $p = 0.016$) and appeared higher, although not significant, in patients with above normal LDH, a marker of tumor proliferation and disease burden[12].

› Do cell free DNA genomics reproduce bone marrow genomics in multiple myeloma?

The MYELSTONE project was born out of the premise that mutation detection by cfDNA instead of BM derived tumour DNA would enable enrolment onto targeted agent studies and facilitate serial molecular monitoring. The study was designed in parallel with a phase II clinical trial of the MEK inhibitor, trametinib (TMTB), which stratified participants into biomarker-positive or negative groups based on clinical grade testing for *KRAS*, *NRAS*, or *BRAF* mutations (PHL-9460, NCT01989598). To increase the power of the study, we enrolled an additional 40 patients undergoing routine care. For mutation detection we utilized a targeted deep sequencing approach based on a modified version of the CAPP-Seq method[13]. Rather than looking only at mutation hotspots, a strategy used by the majority of other methods exploring ctDNA detection, capture-based NGS-based methods allow for detection of all major classes of mutations including single nucleotide variants, indels, rearrangement, and CNAs. Further, such methods are scalable such that large portions of the genome can be examined. Our initial target capture panel focused on all exons of *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* with > 20,000 X median coverage. Also included were mutations of *PIK3CA* and *EGFR* that served as controls for infrequently altered genes in MM.

Consistent with large-scale genomic studies of MM, BM and cfDNA sequencing revealed a high prevalence of MAPK pathway mutations[2,3]. By cfDNA analysis we identified somatic mutations in 68% of patients (AFs ranging from 0.25 to 46%), including *KRAS* (38%), *NRAS* (23%), and *BRAF* (11%) mutations and several mutations of unknown significance in *EGFR* and *PIK-3CA*[12]. Importantly, cfDNA mutation calls were highly concordant with those of matching BM-derived tumour DNA (96% sensitivity and 98% specificity). All 13 patients enrolled onto PHL-9460 would have been correctly assigned to the appropriate biomarker group using cfDNA analysis. These data demonstrate the potential of cfDNA analysis as a minimally invasive platform for genotyping of MM.

We further examined whether the clonal frequencies of mutations in BM were recapitulated by ctDNA in 11 patients with multiple mutations within the same or different genes. Overall, BM-derived subclonal hierarchy was replicated in plasma-derived DNA with good correlation (R^2 range 0.913 to 0.997)[12]. These findings demonstrate the ability to reconstruct of subclonal hierarchies by cfDNA sequencing. Further, four mutations were found in cfDNA and that were not detected BM tumor-derived DNA, including mutations of *PIK3CA* uncovered in 2 patients[12]. As these mutations were consistent across serial blood draws, we suspect that these mutations were present in subclones in metastatic tumour sites and not in the BM site sampled. Indeed, clinical correlation revealed that one of these patients had progressed with extramedullary disease within the pancreas, adrenals, and liver. Thus cfDNA sequence analysis can establish subclonal populations at high resolution, including clones not represented in the lesion sampled by BM aspiration.

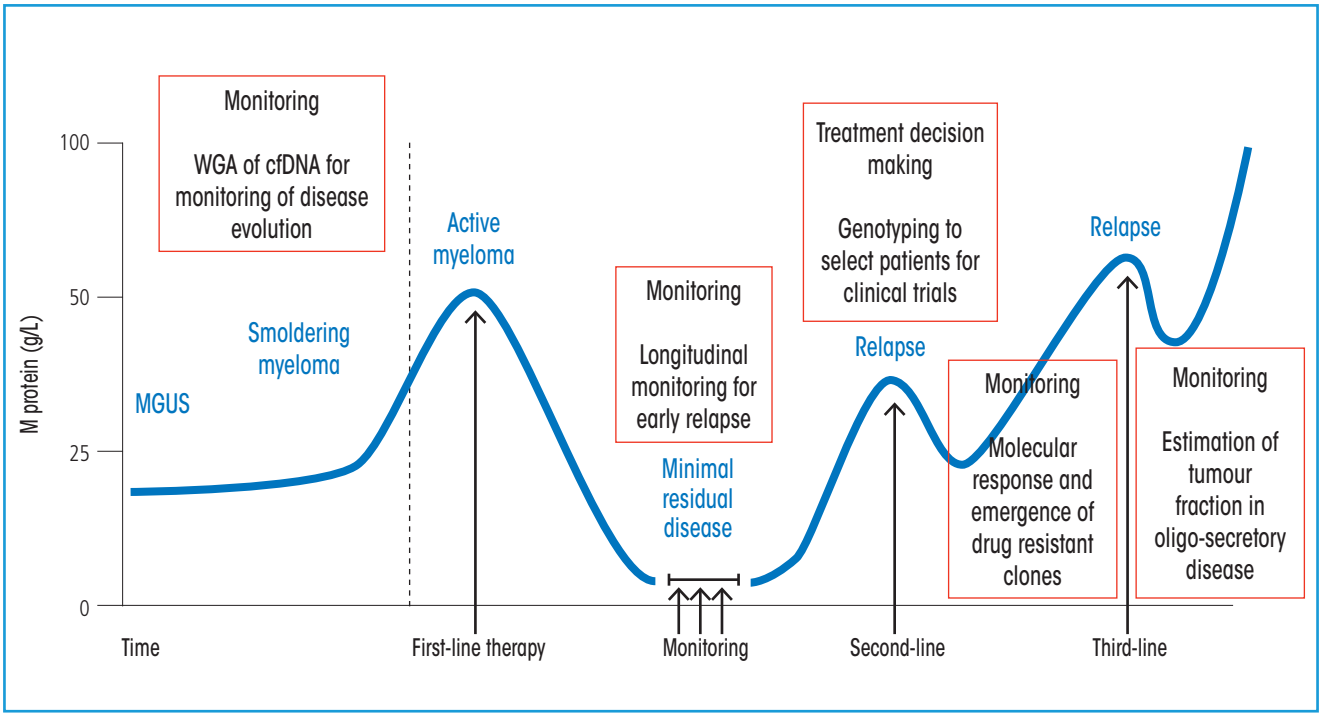


Figure 1. Clinical application of cell free DNA (ctDNA) analysis in multiple myeloma (MM).

› Clinical application of targeted sequencing of cell free DNA in multiple myeloma (Figure 1)

As a next step, we have constructed a comprehensive, single tube, MM-specific capture panel for targeted NGS[14]. This panel allows for one-step identification of IgH translocations, V(D)J clonal rearrangement, CNAs, and somatic mutations in genes associated with prognosis (18 genes), and others that are potentially actionable or are associated with drug resistance (20 genes). To overcome the potential loss of sensitivity with increased panel size, we are applying duplex sequencing methodology with molecular barcoding to suppress polymerase or sequencer errors. With these modifications to increase sensitivity, we postulate that breakpoint identification and V(D)J clonal rearrangement may allow for non-invasive sequential tracking at an estimated threshold of 10^{-4}.

We have shown that the larger targeted gene panel detects additional SNV in plasma that were not identified by the 5 gene panel. Further CNA including del(13q), del(17p), 1q and myc amplifications identified in BM were reproducible in cfDNA[14]. Serial monitoring of BM and cfDNA derived from TMTB treated patients using the more comprehensive MM specific gene panel demonstrated changes in SNVs and AFs over the course of treatment and at progression that were not apparent with the 5 gene panel[14]. In some patients, disease progression was associated with the appearance of new subclonal mutations. Further, in 2 cases these were only identified in cfDNA and not in the paired BM sample. Thus the findings of cfDNA analysis support clonal evolution as a mechanism driving progression of disease which in some instances occurred outside of the sampled BM site.

Finally, we have also observed that sequential monitoring of tumor clones and subclones using targeted sequencing of cfDNA may provide insights into mechanisms of drug resistance. For example, 2 patients treated with TMTB and assigned to the biomarker positive group progressed with corresponding increases in the AFs of *NRAS* p.Q61K or *KRAS* p.A146T in BM and plasma, suggesting a MEK independent mechanism of drug resistance[14]. In contrast, a third patient had a marked decrease in the AF of *KRAS* p.G13D in cfDNA and BM at progression (20 and 8.5% pre-TMTB *vs.* 1.4 and 1.1% progression) presumably indicating a differential response within tumor subclones with expansion of a non-*KRAS* mutated clone resulting in clinical failure of TMTB.

› Is discovery-oriented whole genome analysis (WGA) of cell free DNA in multiple myeloma feasible?

Targeted sequencing of cfDNA has the advantage of depth of sequencing and as we have shown is a highly sensitivity method for detection of pre-defined tumor clonal and subclonal genomic alterations in plasma. On the other hand, WES or WGS analysis of cfDNA may provide a more comprehensive, albeit less sensitive approach, for real-time, non-invasive discovery oriented genomic characterization of MM. Using cost effective lpWGS, Jens Lohr's group demonstrated excellent concordance of genome-wide CNA detection between cfDNA and tumor derived DNA in those patients with high ctDNA fraction in plasma[11]. Further, WES of cfDNA appeared to provide a good unbiased proxy for clonal mutations of MM in BM where 93% (75-100%) of clonal mutations in BM were detected in blood plasma. Conversely, 91% (58-98%) of clonal mutations in cfDNA were also detected in BM MM cells[11].

Consistent with targeted sequencing studies, WES/WGS of cfDNA identified differences in subclonal composition between plasma and tumor-derived DNA obtained from a single site BM in some cases[11]. Using similar methodology, Mithraprabhu *et al.*, correspondingly demonstrated spatial heterogeneity where BM and sites of extramedullary disease contained enriched 'tumor specific' genomic alterations whereas ctDNA harbored mutations that originated from all sites[8]. Hence taken together the data suggest that liquid biopsy more accurately reflects multifocal disease then single site BM biopsies due to the more representative sampling.

Finally, limited data thus far indicate that tumor fraction estimated by lpWGS of cfDNA may serve as a longitudinal marker of disease progression and response to therapy where estimation of tumor fraction in plasma mirrored the course of disease as measured by conventional markers[8,11]. This maybe particularly useful for patients with inadequate disease monitoring methodologies such as those with non-secretory or oligosecretory disease. Further, longitudinal cfDNA copy profiles identified by WES with allelic resolution revealed clonal or near-clonal outgrowth of clones coincident with disease progression[11]. These results support the use of WES of cfDNA for comprehensive clonal analysis of cfDNA to track tumor evolution and identify drug resistant clones.

› Conclusions

In summary, cfDNA analysis represents and significant advancement for molecular profiling of patients with MM and hematological malignancies in general. The most immediate application of ctDNA analyses is likely genotyping of MM for prognostication and to select patients for mutation-targeted therapy. Its applicability for real-time, noninvasive monitoring will support its application as a surrogate for drug response and for detection of emergence of drug resistant clones. With improved sensitivity one can foresee its utility for longitudinal monitoring of early disease relapse and potentially minimal residual disease (MRD).

› References

1. Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, Usmani, S, Siegel D, Anderson KC, et al. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. Blood. 2016;127(24):2955-62.
2. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. Nature. 2011;471(7339):467-72.
3. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. Cancer Cell. 2014;25(1):91-101.
4. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, Murison A, Begum DB, Nasrin M, et al. Mutational spectrum, copy number changes, and outcome: results of a sequencing study of patients with newly diagnosed myeloma. J Clin Oncol. 2015;33(33):3911-20.
5. Kortüm KM, Mai EK, Hanafiah NH, Shi C, Zhu Y, Bruins G, et al. Targeted sequencing of refractory myeloma reveals a high incidence of mutations in CRBN and Ras pathway genes. Blood. 2016;128(9):1226-33.
6. Leung-Hagestejin C, Erdmann N, Cheung C, Keats JJ, Stewart AK, Reece DE, et al. Xbp1s-negative tumor B cells and pre-plasmablasts mediate therapeutic proteosome inhibitor resistance in multiple myeloma. Cancer Cell. 2013;24(3):289-304.
7. De Haart SJ, Willems SM, Mutis T, Koudijs MJ, van Blokland MT, Lokhorst HM, et al. Comparison of intramedullary myeloma and corresponding extramedullary soft tissue plasmacytomas using genetic mutational panel analyses. Blood Cancer J. 2016;6:e426.
8. Mithraprabhu S, Sirdesai S, Chen M, Khong T, Spencer A. Circulation tumor DNA analysis for tumor genome characterization and monitoring disease burden in extamedullary multiple myeloma. Int J Mol Sci. 2018;19(7):E1958.

9. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. Blood. 2012;120(5):1067-76.
10. Egan JB, Shi C, Tembe W, Tembe W, Christoforides A, Kurdoglu A, et al. Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. Blood. 2012;120(5):1060-6.
11. Guo G, Raje NS, Seifer C, Kloeber J, Isenhart R, Ha G, et al. Genomic discovery and clonal tracking in multiple myeloma by cell-free DNA sequencing. Leukemia. 2018;32(8):1838-41.
12. Kis O, Kaedbey R, Chow S, Danesh A, Dowar M, Li T, et al. Circulating tumor DNA sequence analysis as an alternative to multiple myeloma bone marrow aspirates. Nat Commun. 2017;8:15086.
13. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NCW, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. Nat Med. 2014;20(5):548-54.
14. Kis O, Chow S, Kaedbey R, Pugh TJ, Trudel S. Targeted sequencing of circulating cell-free DNA in multiple myeloma allows analysis of somatic mutations, copy number aberrations, and translocations. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2017;17(S):A1-A4.

NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS FILADELFIA NEGATIVAS

Coordinadores: **Dr. Juan Carlos Hernández Boluda.** Hospital Clínico Universitario de Valencia
Dr. Manuel Pérez Encinas. Hospital Clínico Universitario de Santiago, Santiago de Compostela

En este simposio se presenta una actualización de aspectos moleculares y clínicos de las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMP) cromosoma Filadelfia negativas.

El estudio genético de las NMP con técnicas de secuenciación masiva ha permitido demostrar la presencia de mutaciones no conductoras que pueden estar implicadas en la evolución de estas patologías hacia la mielofibrosis y la leucemia aguda. Varias mutaciones adicionales tienen especial importancia pronóstica y han sido incluidas en los índices pronósticos que se utilizan a la hora de seleccionar candidatos a trasplante. La Dra. Such nos presentará su experiencia en el análisis genético de las NMP.

La introducción del ruxolitinib en la clínica constituye el avance farmacológico más importante de los últimos años en el tratamiento de los pacientes con mielofibrosis y policitemia vera. Ruxolitinib en general es bien tolerado, pero por su mecanismo de acción tiene efectos inmunosupresores que se traducen en citopenias y un aumento de infecciones. Este hecho puede agravar la situación de pacientes ya de por sí frágiles y con inmunodepresión de base. La Dra. Palandri de la Universidad de Bolonia nos presentará su experiencia en la prevención y manejo de las infecciones en los pacientes tratados con inhibidores de JAK2.

El manejo clínico de las NMP se basa en la prevención de las complicaciones vasculares y el control de los síntomas mediante la antigregación o anticoagulación y la citorreducción. El fármaco citorreductor más empleado es la hidroxicarbamida. Otras opciones son el uso de anagrelida, interferón, ruxolitinib o busulfán. Recientes ensayos prospectivos confirman la eficacia de interferón y probablemente pronto podremos disponer en la práctica clínica de nuevas preparaciones de interferón mejor toleradas. El Dr. Alvarez Larrán, por su parte, presentará una actualización del manejo de la policitemia vera y la trombocitemia esencial.

Dentro de este simposio se ha seleccionado por su calidad la presentación del Dr. Palomino, en nombre de los investigadores del registro RETE, centrada en el análisis de factores de riesgo de trombosis en los pacientes con trombocitemia esencial sin eventos vasculares previos.

Agradecemos a los ponentes su esfuerzo y esperamos que este simposio cumpla con los objetivos de formación y comunicación de avances que pueden beneficiar a nuestros pacientes.

Infections in patients with myelofibrosis and polycythemia vera treated with ruxolitinib

Francesca Palandri, Christian Di Pietro
Institute of Hematology "L. and A. Seràgnoli", Sant'Orsola-Malpighi University Hospital, Bologna

› Introduction

Ruxolitinib is a potent and selective oral inhibitor of both *JAK2* and *JAK1* protein kinases (IC 50: 2.8 and 3.3 nM, respectively). It is currently indicated for the treatment of splenomegaly and symptoms in patients with primary, post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis. Ruxolitinib is also indicated for the treatment of patients with polycythemia vera who have had an inadequate response, or are intolerant to hydroxyurea. The drug is not specific for the mutated form of *JAK2* and inhibits both the wild-type and *JAK2*V617F[1].

The anti-JAK2 inhibitory action is responsible for the efficacy of ruxolitinib on the control of myeloproliferation, reducing splenomegaly. The inhibition of wild-type JAK2 protein however is also responsible for the myelosuppressive action, mainly anemia and thrombocytopenia that occur in over 40 and 15% of patients, respectively. The anti-JAK1 inhibitory action is responsible for the reduction of pro-inflammatory cytokines, abnormally expressed in myelofibrosis, with a substantial improvement of systemic symptoms. Since the immune system and the hematopoietic system share intracellular signalling pathways, mediated by common receptors for cytokines and growth factors, this anti-cytokine action may be responsible for a potential immunosuppressive effect of the drug, which has been associated with increased infectious risk[2].

› Immunomodulatory effects of ruxolitinib

Available evidence suggests that ruxolitinib acts on cellular components of both innate and adaptive immunity[3]. Figure 1 summarizes the complex relationship between ruxolitinib and the immune "orchestra", including natural killers (NKs cells), dendritic cells (DCs), and T cells.

› *Natural killer cells*

NKs are large lymphocyte-like cells with distinctive cytotoxic granules that can detect and exert lytic activity on certain virus-infected cells, as well as on malignant cells. NKs also produce cytokines, mainly interferon (IFN)-gamma and TNF-alpha, which modulate the differentiation of cells involved in adaptive immunity (Th1) and induce the maturation of DCs. A recent study on 28 MPNs patients with or without ruxolitinib treatment and 24 healthy individuals found a reduction in NKs number and killing activity in ruxolitinib-treated patients that was due to inhibition of the JAK1-JAK3/STAT5 pathway downstream of the IL-2- and IL-15 receptors[4].

› *Dendritic cells*

DCs are important antigen presenting cells (APC) and phagocytic cells; as macrophages, they are responsible for presenting antigens to T lymphocytes and initiating adaptive immunity. Heine and coworkers demonstrated *in vitro* and *in vivo* that *JAK1/2* inhibitor therapy affects cell differentiation, tissue migration and function of DCs resulting in impaired induction of allogenic or antigen-specific T-cell responses, including viral clearance[5].

› *CD4+ T cells*

CD4+ T cells, which differentiate from *naïve* T cells, are a heterogeneous cell population that secrete cytokines/chemokines that induce and/or recruit T-helper and Treg cell types. Tregs suppress autoreactive lymphocytes, prevent autoimmune disease, and control viral, fungal and protozoan infections. A study by Parampalli

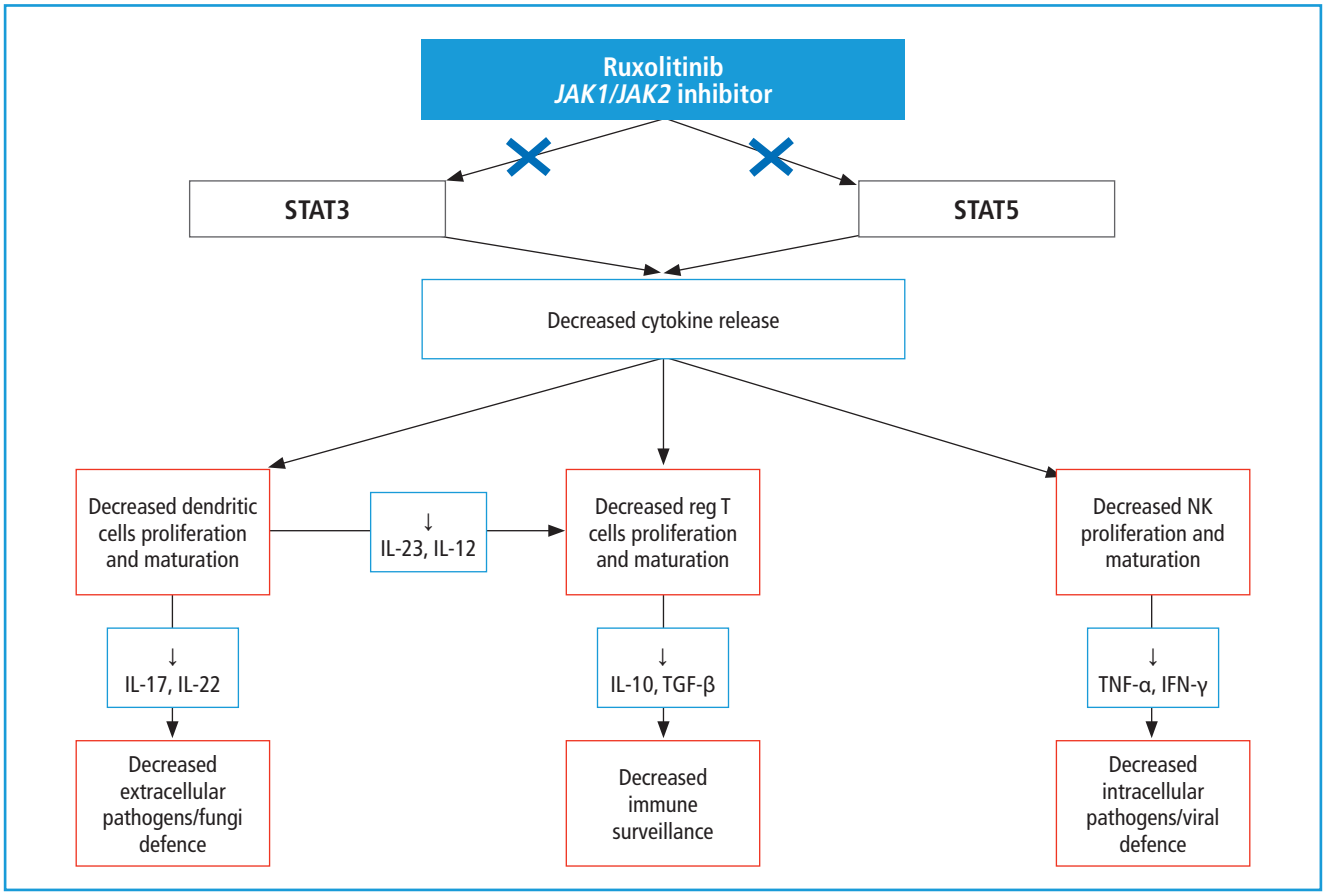


Figure 1. Known interactions between ruxolitinib and immune system.

et al. highlighted a reduction in total CD3+ cells, Th1, Th17 and Tregs after 3 weeks of ruxolitinib treatment in MPNs patients[6]. Accordingly, Massa *et al.* showed that ruxolitinib resulted in a long-lasting but reversible reduction in circulating Tregs[7]. C. Keohane *et al.* demonstrated that *JAK* inhibition induces silencing of T helper cytokine secretion and a profound reduction in T regulatory cells[8].

› *Monocytes*

Recently, Fisher *et al.* demonstrated that monocytes are the cell population most responsible for cytokine overproduction in myelofibrosis and ruxolitinib therapy reduces but not abrogates cytokine overproduction and NF-κB/MAP kinase hyperactivation. This finding is due to the fact that cytokines overproduction is driven by multiple signalling pathways beyond JAK-STAT, suggesting a potential benefits from NF-κB and/or MAP kinase inhibition in myelofibrosis therapy[9].

› Infectious events during ruxolitinib therapy

› *Myelofibrosis*

The possibility that ruxolitinib may increase the infectious risk of patients with MF was first suggested by the results of the *COMFORT-I* and *COMFORT-II* trials[10,11].

In the *COMFORT-I* study, patients treated with ruxolitinib had higher rates of bacterial and *Herpes zoster* (VZV) infections than patients treated with placebo. The incidence of urinary tract infections and VZV was 10.5 and 2.1%, respectively, in the first 12 weeks of therapy, 6.7 and 3.5% between 12 and 24 weeks, 7.7 and 3.4% between 24 and 36 weeks. The recent 5-year update of the study showed a 14.2% incidence of pneumonitis in the ruxolitinib arm, respect to 5.3% in the placebo arm and 7.2% in the placebo arm with subsequent crossover; the incidence of VZV infections for 100 patients/year were 3.5 in the ruxolitinib arm, 1 in the placebo arm and 5.8 in the crossover[12].

Table 1. Evaluation of infectious risk before RUX start

	Medical history and physical examination	Laboratory exams
Generic infectious risk	Medical history for previous infectious events, including herpes simplex/zoster infections	Complete blood count
	Physical examination to exclude active *simplex/zoster* infection and oral candidiasis	Urine analysis if previous history of urinary tract infections
TBC	Exclude recent contact with subjects coming from endemic regions or with active TBC	IFN-gamma release test (Quantiferon)
	Chest physical examination	Chest X-ray
HBV	Investigate risk factors for virus exposure/previous HBV vaccination	HBsAg, HBeAg, anti-Hbe, anti-HBc, anti-HBs
HCV	Investigate risk factors for virus exposure	Anti-HCV Ab
HIV	Investigate risk factors for virus exposure	HIV serology

In the *COMFORT-II* study, most infections were grade I/II. In particular, VZV infections (11.5%), pneumonia (13.1%), sepsis (7.9%) and urinary tract infections (24.6%) were reported, with only 2 confirmed cases of tuberculosis (1%). In both *COMFORT* studies, the incidence of severe infections in patients treated with ruxolitinib was similar to that observed in patients in the control group[13].

In the *JUMP* study (a phase 3b expanded-access trial), the incidence of infections was low: pneumonia (6.2%), urinary tract infections (5.7%) and nasopharyngitis (5.3%). Tuberculosis was reported in 5 patients (0.3%); the reactivation of hepatitis B virus (HBV) in 1 patient (0.1%), while the incidence of VZV infections is 4.5%[14].

With increasing use of ruxolitinib in clinical practice, cases of HBV reactivation and severe and uncommon infections including *Cryptococcus neoformans* pneumonia, toxoplasmosis retinitis, disseminated tuberculosis, and progressive multifocal leukoencephalopathy were reported[15].

A multicenter retrospective study on a large cohort of 446 patients with MF treated with ruxolitinib showed that almost 30% of patients experienced infectious events, mainly pulmonary. The rate of infections tended to decrease with time. Previous infections and a high risk category correlated significantly with a greater risk of infections. Of note, splenomegaly reduction by ≥ 50% from baseline to 6 months was significantly associated with longer infection-free survival[16].

› *Polycythemia vera*

In the PV setting, a randomized phase 3 trial which compared ruxolitinib *versus* best supportive care (*RESPONSE* study) showed that the rate of grade 3/4 infections at week 32 was 3.6 and 2.7%, respectively, similar in both ruxolitinib-treated patients and the control group treated with the best available therapy. Nonetheless, the rates of VZV infection were higher in patients receiving ruxolitinib as respect to best available therapy (per 100 patient-years of exposure: 5.4 *versus* none)[17]. A recent metanalysis confirmed that the risk of VZV infections in higher in PV patients treated with ruxolitinib[18].

Similar results were obtained from the randomized study *RESPONSE-2*, enrolling PV patients without splenomegaly. Grade 3 infections were rare (2 cases in the ruxolitinib group; influenza and bronchitis) and one case (influenza) in the control group. No pneumonia or TB reactivation was diagnosed in the ruxolitinib group[19].

› Real-life recommendations before and during ruxolitinib therapy

Infectious screening

An infectious screening is recommended before ruxolitinib start (Table 1)[20].

Before starting treatment with ruxolitinib, patients should be screened for HBV infection by dosing the viral markers HBsAg, HBeAg, anti-HBe, anti-HBc and anti-HBs. Dosage of plasma HBV-DNA by polymerase chain reaction should be reserved for patients with signs of active infection (HBsAg positive with or without positive

HBeAg) or resolved infection (anti-HBc positive with or without positive HBeAg).

If HCV serology is positive, the presence of HCV-RNA by polymerase chain reaction and the presence of chronic liver disease should be investigated by laboratory tests, liver and spleen ultrasound, and staging of parenchymal fibrosis by elastosonography and/or liver biopsy.

No screening tests are required for *Herpes zoster* infection, *Herpes simplex*, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and *Toxoplasma gondii* before initiation of therapy with ruxolitinib. However, patients with previous significant infections from these pathogens should be referred to the infectious specialist for specific evaluation.

› *Primary and secondary prophylaxis*

HBsAg positive patients should receive a prophylaxis against hepatitis reactivation. The use of lamivudine is limited to patients with not dosable serum HBV-DNA, whereas the use of nucleosides/nucleotides with a high genetic barrier (entecavir, tenofovir) is preferable in cases with dosable HBV-DNA. In patients with resolved HBV infection treated with ruxolitinib, no cases are reported of reverse seroconversion. Therefore, prophylaxis is only indicated in the infrequent case of dosability of HBV-DNA in the serum before the start of therapy (patients with occult infection). In all other cases monitoring of alanine-aminotransferase (ALT) every month and of HBsAg and anti-HBs every 6 months is indicated. ALT increase and/or reverse seroconversion with HBV-DNA positivity indicate the need to initiate prophylaxis.

Patients with advanced chronic hepatitis or HCV-related liver cirrhosis may be candidates for virus eradication treatment using direct antivirals before the start of treatment with ruxolitinib. No data are available on safety and efficacy of co-administration of antiviral therapy and ruxolitinib. In case of diagnosis of HCV-related hepatitis during treatment, ruxolitinib discontinuation should be evaluated.

Patients with latent tubercular infection should undergo prophylaxis by single dose isoniazid daily at a dose of 5 mg/kg up to a maximum dose of 300 mg a day for at least 9 months.

Live vaccines are not recommended in all patients with MF in treatment with ruxolitinib.

Primary prophylaxis of herpes infections is not recommended. Secondary prophylaxis with oral acyclovir (400 mg every 12 hours) may be considered in patients that have severe or recurrent HSV/VZV infections.

Prophylaxis antibacterial, antifungal and against *Pneumocystis jirovecii* is not recommended.

› Treatment of infections during ruxolitinib

Treatment of infections should be decided based on current guidelines, according to patients' comorbidities, risk factors, and infection severity.

Ruxolitinib may be discontinued in case of particularly severe infection and/or during treatments that may have metabolic interactions with ruxolitinib (i.e.: rifampin, antifungal agents). In case of ruxolitinib discontinuation, tapering of ruxolitinib is recommended in order to avoid a rebound syndrome.

› References

1. Griesshammer M, Sadjadian P. The BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms: a review of JAK inhibitors in the therapeutic armamentarium. Expert Opin Pharmacother. 2017;18(18):1929-38.
2. Maschmeyer G, De Greef J, Mellinghoff SC, Nosari A, Thiebaut-Bertrand A, Bergeron A, et al.; European Conference on Infections in Leukemia (ECIL). Infections associated with immunotherapeutic and molecular targeted agents in hematology and oncology. A position paper by the European Conference on Infections in Leukemia (ECIL). Leukemia. 2019 Apr;33(4):844-62.
3. McLornan DP, Khan AA, Harrison CN. Immunological Consequences of JAK Inhibition: Friend or Foe? Curr Hematol Malig Rep. 2015;10(4):370-9.
4. Schönberg K, Rudolph J, Vonnahme M, Parampalli Yajnanarayana S, Cornez I, Hejazi M, et al. JAK Inhibition Impairs NK Cell Function in Myeloproliferative Neoplasms. Cancer Res. 2015;75(11):2187-99.
5. Heine A, Held SA, Daecke SN, Wallner S, Yajnanarayana SP, Kurts C, et al. The JAK-inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell function in vitro and in vivo. Blood. 2013;122(7):1192-202.
6. Parampalli Yajnanarayana S, Stubig T, Cornez I, Alchalby H, Schönberg K, Rudolph J, et al. JAK1/2 inhibition impairs T cell function in vitro and in patients with myeloproliferative neoplasms. Br J Haematol. 2015;169(6):824-33.
7. Massa M, Rosti V, Campanelli R, Fois G, Barosi G. Rapid and long-lasting decrease of T-regulatory cells in patients with myelofibrosis treated with ruxolitinib. Leukemia. 2014;28(2):449-51.
8. Keohane C, Kordasti S, Seidl T, Pérez Abellán P, Thomas NS, Harrison CN, et al. JAK inhibition induces silencing of T Helper cytokine secretion and a profound reduction in T regulatory cells. Br J Haematol. 2015;171(1):60-73.
9. Fisher DAC, Miner CA, Engle EK, Hu H, Collins TB, Zhou A, et al. Cytokine production in myelofibrosis exhibits differential responsiveness to JAK-STAT, MAP kinase, and NFκB signaling. Leukemia. 2019 Feb 4. [Epub ahead of print].

10. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Gupta V, DiPersio JF, Catalano JV, et al.; COMFORT-I investigators. Long-term treatment with ruxolitinib for patients with myelofibrosis: 5-year update from the randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 COMFORT-I trial. J Hematol Oncol. 2017;10(1):55.
11. 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.
12. Verstovsek S, Gotlib J, Mesa RA, Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Cervantes F, et al. Long-term survival in patients treated with ruxolitinib for myelofibrosis: COMFORT-I and -II pooled analyses. J Hematol Oncol. 2017;10(1):156.
13. Vannucchi AM, Kantarjian HM, Kiladjian JJ, Gotlib J, Cervantes F, Mesa RA, et al.; COMFORT Investigators. 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. Al-Ali HK, Griesshammer M, le Coutre P, Waller CF, Liberati AM, Schafhausen P, et al. Safety and efficacy of ruxolitinib in an open-label, multicenter, single-arm phase 3b expanded-access study in patients with myelofibrosis: a snapshot of 1144 patients in the JUMP trial. Haematologica. 2016;101(9):1065-73.
15. Caocci G, Murgia F, Podda L, Solinas A, Atzeni S, La Nasa G. Reactivation of hepatitis B virus infection following ruxolitinib treatment in a patient with myelofibrosis. Leukemia. 2014;28(1):225-7.
16. Polverelli N, Palumbo GA, Binotto G, Abruzzese E, Benevolo G, Bergamaschi M, et al. Epidemiology, outcome, and risk factors for infectious complications in myelofibrosis patients receiving ruxolitinib: a multicenter study on 446 patients. Hematol Oncol. 2018 Apr 6. [Epub ahead of print].
17. Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Griesshammer M, Masszi T, Durrant S, Passamonti F, et al. Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. N Engl J Med. 2015;372(5):426-35.
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. Passamonti F, Griesshammer M, Palandri F, Egyed M, Benevolo G, Devos T, et al. Ruxolitinib for the treatment of inadequately controlled polycythaemia vera without splenomegaly (RESPONSE-2): a randomised, open-label, phase 3b study. Lancet Oncol. 2017;18(1):88-99.
20. Heine A, Brossart P, Wolf D. Ruxolitinib is a potent immunosuppressive compound: is it time for anti-infective prophylaxis? Blood. 2013;122(23):3843-4.

Tratamiento actual de la trombocitemia esencial y la policitemia vera

Alberto Álvarez Larrán
Servicio de Hematología, Hospital Clínic, Barcelona

› Objetivos del tratamiento[1]

• Prevenir la aparición de complicaciones trombóticas y hemorrágicas.
• Controlar los síntomas asociados a la enfermedad.
• Minimizar el riesgo de transformación a leucemia aguda o mielofibrosis.
• Manejar situaciones de riesgo, como el embarazo o la cirugía.

› Tratamiento de la trombocitemia esencial (TE)

› *Estratificación según el riesgo de trombosis*

Las actuales recomendaciones de la European Leukemia Net (ELN) aconsejan seleccionar el tratamiento según la estratificación clásica del riesgo de trombosis basada en la edad de los pacientes y la existencia o no de historia de trombosis. Los pacientes menores de 60 años sin historia de trombosis se consideran de bajo riesgo de trombosis, mientras que los pacientes mayores de 60 años y/o con historia de trombosis se consideran de alto riesgo. Asimismo, se reconoce la existencia de un grupo de muy bajo riesgo de trombosis en el que la incidencia de trombosis es similar a la población general, que se correspondería a aquellos pacientes menores de 60 años sin historia de trombosis, ausencia de mutación *JAK2*V617F y que tampoco presentan factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, hipercolesterolemia, diabetes, tabaquismo)[1]. Los pacientes de bajo riesgo que durante la evolución de la enfermedad alcanzan una edad > 60 años o bien desarrollan complicaciones trombóticas pasarán a considerarse de alto riesgo.

› *Tratamiento de los pacientes de bajo riesgo*

Es importante tener en cuenta que la incidencia de trombosis en pacientes con TE de bajo riesgo es similar a la de la población general y que la administración de antiagregantes a pacientes de bajo riesgo que no reciben tratamiento citorreductor puede incrementar el riesgo de hemorragia asociado a la trombocitosis[2,3].

Actualmente, se recomienda la administración de antiagregantes (ácido acetilsalicílico –AAS– 100 mg/día) a todos los pacientes con TE de bajo riesgo portadores de la mutación *JAK2*V617F o con factores de riesgo cardiovascular[1-3]. En el resto de los pacientes de bajo riesgo la observación sin tratamiento es una opción razonable[1-3]. Es importante destacar que los antiagregantes pueden incrementar el riesgo de hemorragia en los pacientes con trombocitosis extrema (plaquetas > 1.500 × 10^9/L), por lo que en estos casos se recomienda la administración de citorreducción[1-3]. Además de su papel en la prevención primaria de trombosis, el AAS a bajas dosis es el tratamiento de elección para los pacientes que presentan clínica microvascular (cefalea, parestesias, eritromelalgia)[1]. El tratamiento citorreductor también está indicado cuando los síntomas microvasculares persisten a pesar del tratamiento antiagregante[1].

› *Tratamiento de los pacientes de alto riesgo*

Existe un consenso unánime en administrar tratamiento citorreductor a todos los pacientes con TE de alto riesgo[1]. Dentro de las diferentes modalidades de tratamiento citorreductor, la hidroxiurea constituye la mejor opción en primera línea[4]. Algunos autores recomiendan evitar el uso de hidroxiurea en pacientes menores de 40-50 años, siendo la anagrelida o el interferón las opciones más adecuadas en estos casos[1,5].

La dosis inicial de hidroxiurea debe ajustarse para conseguir controlar los síntomas y normalizar los recuentos plaquetarios sin inducir anemia o neutropenia. Sin embargo, en pacientes que requieren dosis muy altas de tratamiento citorreductor, una cifra de plaquetas < 600 × 10^9/L puede ser un objetivo razona-

ble si ello conlleva una mejor tolerancia al tratamiento, ya que no se ha podido demostrar que la normalización de la cifra de plaquetas se asocie a un menor riesgo de trombosis[6].

La mayoría de los pacientes tolera bien la hidroxiurea. En torno al 20% desarrolla resistencia o intolerancia al fármaco. La resistencia primaria a la hidroxiurea es muy infrecuente. Algunos pacientes desarrollan resistencia secundaria, generalmente en forma de aparición simultánea de trombocitosis y citopenias como leucopenia o anemia que impiden aumentar las dosis. La intolerancia a la hidroxiurea suele manifestarse en forma de úlceras cutáneas o mucosas, lesiones en la piel y molestias gastrointestinales[6].

Los pacientes con resistencia o intolerancia a la hidroxiurea son candidatos a tratamiento de segunda línea, siendo la anagrelida el tratamiento de elección. La dosis inicial de anagrelida es de 0,5 mg/12 h, con posterior ajuste de dosis para conseguir la normalización en la cifra de plaquetas. Hasta un 30% de los pacientes suspenden el tratamiento por efectos secundarios, siendo los más frecuentes las palpitaciones, la cefalea, la retención de líquidos y la anemia. De forma infrecuente puede aparecer miocardiopatía e insuficiencia cardiaca[1,5].

En aquellos pacientes con contraindicación para la anagrelida o que han fracasado a la misma, el busulfán podría ser alternativa en pacientes de edad avanzada, si bien debe considerarse su elevado potencial leucemógeno. En pacientes jóvenes, el interferón alfa pegilado es una opción para individuos con criterios de alto riesgo que no toleran la hidroxiurea o la anagrelida[1].

El tratamiento antiagregante está indicado en todos los pacientes con antecedente de trombosis arterial[1]. En los pacientes con trombosis venosa está indicada la asociación de anticoagulantes y tratamiento citorreductor[1,7]. También se recomienda añadir antiagregantes en estos pacientes, como profilaxis primaria de la trombosis, especialmente en mayores de 60 años[1,8].

› Tratamiento de la policitemia vera (PV)

› *Principios generales del tratamiento*

Se basa en reducir rápidamente la masa eritrocitaria mediante sangrías, administrar antiagregantes a dosis bajas y corregir de forma estricta los factores de riesgo cardiovascular como la diabetes, la hipertensión arterial, la hipercolesterolemia y el tabaquismo[1].

El tratamiento citorreductor está indicado al diagnóstico en pacientes con edad > 60 años, con historia de trombosis o con trombocitosis extrema (plaquetas > 1.500 × 10^9/L). Además, la mala tolerancia a las sangrías, la necesidad de una alta frecuencia de flebotomías para mantener controlado el hematocrito, la presencia de síntomas debidos a la PV que no mejoran con los antiagregantes, la aparición de complicaciones trombóticas o hemorrágicas durante el seguimiento o aquellos pacientes que alcanzan los 60 años de edad durante el seguimiento también constituyen indicaciones para iniciar tratamiento citorreductor[1].

Estudios observacionales clásicos y un estudio aleatorizado han demostrado que la incidencia de trombosis es más baja en los pacientes que mantienen un hematocrito por debajo del 45%, por lo que este debe ser el objetivo de tratamiento cualquiera que sea la modalidad terapéutica seleccionada[9].

› *Flebotomías*

Su objetivo es reducir de forma rápida el riesgo trombótico asociado a la hiperviscosidad sanguínea y mejorar así el flujo sanguíneo arterial y venoso. Se efectúan a razón de 450 mL cada 3-4 días hasta conseguir un hematocrito inferior a 0,45 L/L y 0,42 L/L, en hombres y mujeres, respectivamente. En pacientes de edad muy avanzada o con problemas cardiovasculares, es aconsejable no reducir el hematocrito tan rápidamente y realizar sangrías de 200-300 mL 2 veces por semana. Una vez normalizado el hematocrito, los controles cada 4-8 semanas establecerán la frecuencia de futuras sangrías, indicándose generalmente cuando el hematocrito es > 0,48 L/L.

› *Antiagregantes plaquetarios*

El estudio *ECLAP*, realizado en pacientes con PV en su mayoría sin antecedente de trombosis, demostró que la adición de AAS (100 mg/día) al tratamiento estándar (sangrías o citorreducción) era eficaz en la prevención primaria de trombosis[10]. Desde la publicación de dicho estudio, el AAS a dosis de 100 mg cada 24 h está indicado en pacientes con PV aunque no tengan antecedente de trombosis.

En los pacientes con historia de trombosis arterial, están indicados los antiagregantes plaquetarios

como profilaxis secundaria de trombosis, usándose en estos casos tanto el AAS (a dosis de 100-300 mg/día) como el clopidogrel según la patología.

› *Hidroxiurea*

Actualmente, la hidroxiurea es el agente citorreductor más utilizado en el tratamiento de la PV y constituye el tratamiento de elección en primera línea. La dosis inicial es de 500-1.000 mg/día con posterior ajuste de dosis según los valores del hemograma. La hidroxiurea consigue un control adecuado de la enfermedad en el 90% de los pacientes. Suele tolerarse bien; no obstante, un 11% de los pacientes presenta intolerancia generalmente en forma de úlceras cutáneas o intolerancia gastrointestinal[11]. Los pacientes que no toleran la hidroxiurea o que cumplen los criterios de resistencia definidos por la ELN son candidatos a tratamiento de segunda línea[1]. El ruxolitinib constituye actualmente el fármaco de elección en estos casos[1].

› *Ruxolitinib*

El ruxolitinib ha sido recientemente aprobado como tratamiento de la PV en pacientes que presentan resistencia o intolerancia a la hidroxiurea. Los resultados del estudio aleatorizado *RESPONSE* demostraron la superioridad de ruxolitinib frente a la mejor terapia disponible. El 60% de los pacientes tratados con ruxolitinib consiguió controlar el hematocrito sin necesidad de flebotomías, en la mayoría de los casos de forma mantenida. Además, una importante proporción de los pacientes presentó una mejoría significativa de los síntomas asociados a la enfermedad y logró reducir el tamaño de la esplenomegalia. La dosis inicial es de 10 mg/12 horas con posterior ajuste de dosis para conseguir el control del hematocrito[12].

› *Interferón alfa pegilado*

Estudios en fase II que incluyeron un reducido número de pacientes han mostrado que el interferón alfa-2a pegilado a la dosis inicial de 90 µg/semana consigue un 70-95% de respuestas hematológicas completas, así como un notable número de respuestas moleculares, todo ello acompañado de una baja tasa de complicaciones trombóticas y adecuada tolerancia. Algunos pacientes incluso presentan respuestas mantenidas tras la suspensión del fármaco[13,14]. Existe una nueva formulación de interferón alfa-2b pegilado (ropeginterferón) que permite una dosificación bisemanal. Recientemente, la European Medicines Agency (EMA) ha emitido un dictamen favorable para el uso de ropeginterferón en pacientes con PV sin esplenomegalia sintomática.

› *Anagrelida*

La anagrelida puede ser una opción adecuada, en combinación con flebotomías, en el paciente joven con trombocitosis como único criterio para administrar tratamiento citorreductor. En pacientes que reciben tratamiento con hidroxiurea o con ruxolitinib que presentan trombocitosis de difícil control, la adición de anagrelida podría ser de utilidad.

› *Busulfán*

El busulfán puede lograr una mielodepresión prolongada a dosis bajas. Su mayor inconveniente reside en su potente acción alquilante, lo cual conlleva un elevado riesgo de aplasia medular y leucemia aguda. La dosis habitual es de 2 mg/día, con un estrecho control hematológico para suspender el fármaco cuando se consigue la normalización de la cifra de leucocitos y plaquetas[15]. Su principal indicación es en pacientes de edad avanzada que han presentado toxicidad a la hidroxiurea (más de 75 años)[15].

› *Medidas complementarias*

- Administrar alopurinol si la hiperuricemia es > 8 mg/dL o inferior con síntomas.
- Si se presenta prurito: evitar los desencadenantes (ducha muy caliente, fricción intensa de la piel), administrar tratamiento citorreductor (los más eficaces son el ruxolitinib y el interferón), antihistamínicos, inhibidores de la recaptación de serotonina (paroxetina) y fototerapia.
- Evitar la administración de hierro.

› Conclusiones finales

- El tratamiento actual de la TE se basa en la estratificación pronóstica según el riesgo de trombosis y hemorragia.
- Los pacientes menores de 60 años sin antecedente de trombosis se consideran de bajo riesgo y pueden manejarse de forma conservadora.

• El tratamiento citorreductor está indicado en los pacientes de alto riesgo (edad mayor de 60 años y/o historia de trombosis) y en casos seleccionados de bajo riesgo (síntomas asociados a la enfermedad, trombocitosis extrema).

• El objetivo fundamental del tratamiento en la PV es mantener el hematocrito < 45% cualquiera que sea la modalidad terapéutica seleccionada.

• El interferón pegilado y el ruxolitinib se han posicionado como nuevas modalidades de tratamiento de la PV en primera y segunda línea, respectivamente.

› Bibliografía

1. Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM, Passamonti F, Silver RT, Hoffman R, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. Leukemia. 2018;32(5):1057-69.
2. Álvarez-Larrán A, Cervantes F, Pereira A, Arellano-Rodrigo E, Pérez-Andreu V, Hernández-Boluda JC, et al. Observation versus antiplatelet therapy as primary prophylaxis for thrombosis in low-risk essential thrombocythemia. Blood. 2010;116(8):1205-10.
3. Álvarez-Larrán A, Pereira A, Guglielmelli P, Hernández-Boluda JC, Arellano-Rodrigo E, Ferrer-Marín F, et al. Antiplatelet therapy versus observation in low-risk essential thrombocythemia with CALR mutation. Haematologica. 2016;101(8):926-31.
4. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, Wheatley K, East CL, Bareford D, et al. United Kingdom Medical Research Council Primary Thrombocythemia 1 Study. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. N Engl J Med. 2005;353(1):33-45.
5. Gisslinger H, Gotic M, Holowiecki J, Penka M, Thiele J, Kvasnicka HM, et al. Anagrelide compared with hydroxyurea in WHO-classified essential thrombocythemia: the ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial. Blood. 2013 Mar 7;121(10):1720-8.
6. Hernández-Boluda JC, Álvarez-Larrán A, Gómez M, Angona A, Amat P, Bellosillo B, et al. Clinical evaluation of the European LeukaemiaNet criteria for clinicohaematological response and resistance/intolerance to hydroxycarbamide in essential thrombocythaemia. Br J Haematol. 2011;152(1):81-8.
7. Hernández-Boluda JC, Arellano-Rodrigo E, Cervantes F, Álvarez-Larrán A, Gómez M, Barba P. Oral anticoagulation to prevent thrombosis recurrence in polycythemia vera and essential thrombocythemia. Ann Hematol. 2015;94(6):911-8.
8. Álvarez-Larrán, A, Pereira A, Arellano-Rodrigo E, Hernámde-Boluda JC, Cervantes F, Besses C. Cytoreduction plus low-dose aspirin versus cytoreduction alone as primary prophylaxis of thrombosis in patients with high-risk essential thrombocythaemia: an observational study. Br J Haematol. 2013;161(6):865-71.
9. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, Cacciola R, Cavazzina R, Cilloni D, et al. Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. N Engl J Med. 2013; 368(1):22-33.
10. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C, et al. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. N Engl J Med. 2004;350(2):114-24.
11. Álvarez-Larrán A, Pereira A, Cervantes F, Arellano-Rodrigo E, Hernández-Boluda JC, Ferrer-Marín F, et al. Assessment and prognostic value of the European LeukemiaNet criteria for clinicohematologic response, resistance, and intolerance to hydroxyurea in polycythemia vera. Blood. 2012;119(6):1363-9.
12. Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Griesshammer M, Masszi T, Durrant S, Passamonti F, et al. Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. N Engl J Med. 2015 Jan 29;372(5):426-35.
13. Kiladjian JJ, Cassinat B, Chevret S, Turlure P, Cambier N, Roussel M, et al. Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. Blood. 2008;112(8):3065-72.
14. Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Manshouri T, Luthra R, Estrov Z, Pierce S, et al. Pegylated interferon alfa-2a yields high rates of hematologic and molecular response in patients with advanced essential thrombocythemia and polycythemia vera. J Clin Oncol. 2009;27(32):5418-24.
15. Álvarez-Larrán A, Martínez-Avilés L, Hernández-Boluda JC, Ferrer-Marín F, Antelo ML, Burgaleta C, et al. Busulfan in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia refractory or intolerant to hydroxyurea. Ann Hematol. 2014 Dec;93(12):2037-43.

NUEVOS AVANCES Y SU IMPACTO EN EL MANEJO DEL LINFOMA FOLICULAR

Coordinadores: **Dr. Guillermo Rodríguez García.** Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla
Dra. Izaskun Zeberio Etxetxipia. Hospital Universitario Donostia. San Sebastián

Los nuevos avances en el manejo del linfoma folicular se han convertido en un interesante reto clínico que tiene como objetivo diseñar estrategias terapéuticas personalizadas en función de las características basales tanto del paciente como de la enfermedad.

Los resultados de las terapias actualmente disponibles permiten a estos pacientes tener en general una larga expectativa de vida (alrededor de 20 años de mediana), con una elevada supervivencia libre de progresión tras la primera línea de tratamiento (alrededor de 10 años); sin embargo, entre un 15 y un 20% de estos pacientes recaen de forma precoz, en los primeros 24-30 meses, reduciéndose su esperanza de vida a unos 5 años de mediana.

A pesar de los esfuerzos que se han realizado en los últimos años para encontrar índices pronósticos que puedan detectar a este grupo de pacientes de mal pronóstico, aún no disponemos de herramientas que nos permitan identificarlos de forma fiable y poder realizar un tratamiento personalizado. Además, la buena respuesta que presentan la mayoría de los pacientes a los tratamientos actuales dificulta el estudio e introducción de nuevas estrategias terapéuticas, ya que los ensayos clínicos requieren un mínimo de 5-10 años de seguimiento para poder establecer una probable superioridad sobre el estándar de tratamiento. Esta limitación nos ha llevado a buscar nuevos *endpoints* para los ensayos clínicos que nos permitan identificar el beneficio de una nueva terapia en un periodo de tiempo más razonable.

El **Dr. Juan Manuel Sancho** revisará en su exposición los nuevos *endpoints* que podrían facilitar un acceso más ágil de las innovaciones terapéuticas que se encuentran en estudio para el linfoma folicular.

El **Dr. Miguel Ángel Canales** analizará las opciones terapéuticas disponibles para la primera línea de tratamiento, muy debatida desde que disponemos de los resultados de inducción con bendamustina frente al clásico estándar CHOP, ambos combinados con rituximab u obinutuzumab. Además, se revisarán los resultados del tratamiento con lenalidomida-Rrituximab en este contexto.

Finalmente el **Dr. López-Guillermo** expondrá las características y resultados de los distintos esquemas de rescate y las nuevas terapias disponibles, especialmente importantes para los pacientes que recidivan de forma precoz, el mayor desafío al que nos enfrentamos en esta patología por el mal pronóstico asociado.

Enfermedad mínima residual y nuevos *endpoints* en linfoma folicular

Juan Manuel Sancho
Servicio de Hematología Clínica, Institut Català d'Oncologia-Hospital Germans Trias i Pujol, Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras, Universitat Autònoma de Barcelona

› Introducción

El linfoma folicular (LF) es una neoplasia linfoide de células B cuyo origen son las células del centro germinal del folículo linfoide de los ganglios linfáticos. Constituye el segundo linfoma en frecuencia en el mundo occidental tras el linfoma B difuso de célula grande y el más frecuente de los llamados linfomas indolentes o de bajo grado de malignidad. La incidencia aproximada de este tipo de linfoma se sitúa en Europa en torno a 2,18 nuevos casos/100.000 habitantes y año, con una edad mediana de presentación de aproximadamente 60 años y ligero predominio en el género femenino[1-3].

Clínicamente, el LF es un linfoma con predominio de afección ganglionar, que suele presentarse en el momento del diagnóstico en estadios avanzados y que aproximadamente en la mitad de los casos infiltra la médula ósea. Biológicamente, se caracteriza por la presencia de centrocitos y un número variable de centroblastos, con un inmunofenotipo que demuestra positividad para CD20, marcadores de centro germinal como CD10 y BCL-6, y, en general, negatividad de CD5 y CD43. Mayoritariamente, expresan de manera intensa la proteína BCL-2, reflejo de la translocación entre los cromosomas 14 y 18 [t(14;18)], que yuxtapone el oncogén *BCL-2* (en el brazo largo del cromosoma 18) con el gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgH), en el brazo largo del cromosoma 14. De este modo, se estimula la transcripción del gen *BCL-2*, que provoca la sobreexpresión de la proteína BCL-2, un inhibidor de la apoptosis[2,3].

El pronóstico, en general favorable, de este tipo de linfoma ha mejorado en las 2 últimas décadas desde la introducción del anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab al tratamiento. En el momento actual se considera que el tratamiento de inducción para pacientes con LF de nuevo diagnóstico sintomático o de alta carga tumoral debe basarse en pautas de inmunoquimioterapia a partir de los resultados de 4 estudios aleatorizados fase 3 que han confirmado la eficacia de rituximab en combinación con pautas de quimioterapia basadas en alquilantes, con y sin antraciclinas[4-7], con un beneficio en la supervivencia global (SG), como demostró un metaanálisis[8]. Otro reciente estudio aleatorizado[9] ha demostrado aún mayor eficacia (en términos de mayor supervivencia libre de progresión –SLP–) de las pautas de inmunoquimioterapia con el nuevo anticuerpo monoclonal anti-CD20 obinutuzumab en comparación con las pautas de rituximab-quimioterapia.

La administración de tratamientos de postinducción, fundamentalmente mantenimiento en monoterapia con el anticuerpo monoclonal utilizado en la inducción, ha demostrado prolongar la SLP, como se observó en el estudio *PRIMA*[10], en el que los pacientes que habían alcanzado una respuesta tras la inducción con rituximab-quimioterapia y recibieron rituximab de mantenimiento (cada 2 meses durante 2 años) presentaron una SLP significativamente superior respecto a los asignados a la rama de observación (74,9 frente a 57,6% a los 3 años; $p < 0,0001$), con una tasa de remisión completa (RC) a los 2 años de la aleatorización también superior (71,5 frente a 52,5%; $p = 0,0001$).

Una actualización reciente de este estudio[11] observó que hasta un 50% de los pacientes que recibían mantenimiento estaban libres de progresión a los 10 años frente a solo un 35% en la rama de observación, aunque sin diferencias en la SG. Pese a los buenos resultados del tratamiento de primera línea, las recaídas son frecuentes. En la elección del tratamiento en la recaída deben tenerse en cuenta factores del paciente (fundamentalmente la edad y las comorbilidades) y del linfoma, tales como la histología en el momento de la recaída (por la posibilidad de una transformación histológica a linfoma agresi-

vo), la duración de la primera respuesta, así como factores clínico-biológicos (estadio, carga tumoral y Follicular Lymphoma International Prognostic Index –FLIPI– a la recaída, entre otros).

Como se ha citado, el pronóstico de los pacientes con LF es relativamente favorable, reflejo de su comportamiento, por lo general, indolente, con medianas de supervivencia que en la actualidad probablemente superan los 15-20 años en la mayor parte de los casos. Diversas características clínico-biológicas presentes en el momento del diagnóstico se han relacionado con el pronóstico, aunque ninguna de ellas se utiliza en la práctica clínica para decidir hoy en día el tratamiento más adecuado ni sirven para predecir la respuesta en un paciente determinado. Estas características conforman los diferentes índices pronósticos que identifican grupos con diferente pronóstico respecto a SLP y SG. Junto a ellos, de manera reciente se ha hecho hincapié en nuevos factores pronósticos tras el tratamiento, entre los que cabe destacar el papel creciente de la propia respuesta, tanto en lo que se refiere a la calidad de la misma (determinada, entre otros, por el valor de la enfermedad mínima residual –EMR– o por tomografía por emisión de positrones –PET–) como a su duración, lo que ha proporcionado que estas sean consideradas nuevos *endpoints* en los estudios de LF[12].

› Enfermedad mínima residual como *endpoint* en linfoma folicular

Un estudio en la era pre-rituximab del grupo francés describió la influencia de la calidad de la respuesta sobre la supervivencia, al constatar mayor SG en pacientes que alcanzaban RC tras el tratamiento[13]. Este hecho ha sido demostrado de manera firme en la era de la inmunoquimioterapia con rituximab y otros anticuerpos monoclonales como obinutuzumab, especialmente desde la incorporación de técnicas más sensibles para la evaluación de la respuesta como la PET (sola o combinada con tomografía computarizada –TC–) o la EMR[12].

La evaluación de la EMR en sangre periférica (SP) o, sobre todo, en médula ósea (MO), determinada en distintos momentos de la evolución del LF, parece tener significado pronóstico, según han demostrado varios estudios, principalmente en el contexto de varios ensayos clínicos, aunque su determinación no forma parte todavía de la práctica clínica. Entre las distintas maneras de determinar la EMR (por ejemplo, mediante citogenética convencional, hibridación fluorescente *in situ* –FISH–, citometría de flujo, reacción en cadena de la polimerasa –PCR– del reordenamiento *BCL2/IGH*, PCR para reordenamiento *IGH* y técnicas de secuenciación de nueva generación –NGS–), la mayor parte de los estudios han evaluado sobre todo la EMR mediante PCR cuantitativa en tiempo real del reordenamiento *BCL2/IGH*[14]. La determinación de PCR en MO parece preferible a la de SP, ya que, desde la introducción generalizada de rituximab en el tratamiento, el aclaramiento de células B patológicas en el compartimento de SP es muy superior al de la MO[14].

En el momento del diagnóstico, una PCR del reordenamiento *BCL2/IGH* en MO negativa o de escasa cantidad ($< 1 \times 10^{-4}$ copias) se ha asociado a mayor probabilidad de RC y SLP más larga respecto a los pacientes con PCR positiva por encima de 1×10^{-4} copias[15], en línea con los resultados de otro estudio[16], e incluso en el contexto de la recaída[17]. Tras la inducción con inmunoquimioterapia basada en rituximab, varios estudios han relacionado la negatividad de la EMR (determinada en función de los valores del reordenamiento *BCL2/IGH*) con mejor SLP[15,18] e, incluso, en pacientes tratados con inmunoquimioterapia basada en obinutuzumab, la EMR negativa se correlacionó tanto con mejor SLP como con una mejor SG en pacientes de nuevo diagnóstico[19] y en el contexto de la recaída.

En el momento actual se están desarrollando ensayos clínicos en los que la determinación de la EMR se utiliza como herramienta para proponer modificaciones en el tratamiento. Entre los inconvenientes de la PCR cuantitativa del reordenamiento *BCL2/IGH* está el de su sensibilidad, debido a los diferentes puntos de ruptura de la t(14;18), el hecho de que aproximadamente un 10-15% de los LF no tiene la t(14;18) o la consideración de que el LF es una enfermedad de afección predominantemente ganglionar y en la que la negatividad en MO puede no representar el estado de la enfermedad o la heterogeneidad biológica del LF, lo que ha llevado a explorar otras maneras de determinar la EMR, como el ADN circulante. En la Tabla 1 se resumen los principales estudios que han evaluado la EMR en el tratamiento de primera línea del LF[15,16,18-21].

Tabla 1. Principales estudios que analizan el valor pronóstico de la enfermedad mínima residual (EMR) en el tratamiento de primera línea con inmunoquimioterapia en el linfoma folicular (LF)

Estudio (referencia)	Puntos de ruptura	Tratamiento	Negatividad de EMR tras tratamiento	Supervivencia en función de la EMR tras tratamiento (negativa *vs.* positiva)
Rambaldi *et al.*[16]	MBR, mcr	CHOP (+ rituximab si EMR positiva)	73%	FFR a 5 años: 64 *vs.* 32%
Ladetto *et al.*[20]	MBR, mcr, IgH	R-CHOP	44%	SLP a 4 años: 75 *vs.* 21%
		R-TAPH	80%	
Ladetto *et al.*[18]	MBR, mcr	R-FND ± rituximab de consolidación	84% tras mantenimiento	SLP a 34 meses: 72 *vs.* 39%
Galimberti *et al.*[15]	MBR, mcr	R-CHOP, R-CVP o FCR	70%	SLP a 3 años: 66 *vs.* 41%
Zohren *et al.*[21]	MBR	R-CHOP o R-B	85%	Mediana: NA *vs.* 8,7 meses (HR: 3,15)
Pott *et al.*[19]	t(14;18), IgH	Rituximab *vs.* obinutuzumab + CHOP, CVP o bendamustina	74% si RCHOP 87% si RB 93% si obinutuzumab + bendamustina y CHOP	HR: 0,35 (independientemente de la pauta)

HR: *hazard ratio;* NA: no alcanzada; SLP: supervivencia libre de progresión; TAPH: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

Tabla 2. Estudios sobre fracaso precoz (refractariedad y POD24) al tratamiento con inmunoquimioterapia basada en rituximab (R) en pacientes con linfoma folicular (LF)

Estudio (referencia)	Quimioterapia	N	Refractariedad* y /o POD24**	Factores predictivos de refractariedad/POD24	SG
Mozessonh *et al.*[24]	R-quimio (± postinducción)	132	**16,7%***	**FLIPI de alto riesgo**	**47 meses** *vs.* NA
Sorigué *et al.*[25]	R-quimio (± postinducción)	343	**15%***	**FLIPI de alto riesgo** Síntomas B Beta-2 microglobulina	**38% (5 años)** *vs.* 87%
Casulo *et al.*[22]	R-CHOP	588	**19%****	Género varón Síntomas B ECOG Ann Arbor III-IV LDH ↑ **FLIPI de alto riesgo** Raza afroamericana	**50% (5 años)** *vs.* 90%
Murakami *et al.*[23]	R-CHOP	94	**20%****	ECOG ≥ 2 > 4 áreas ganglionares Masa > 6 cm	**48% (5 años)** *vs.* 96%

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group; FLIPI: Follicular Lymphoma International Prognostic Index; LDH: lactato deshidrogenasa; NA: no alcanzada; POD24: progresión en los primeros 24 meses desde el diagnóstico; SG: supervivencia global

› Duración de respuesta como *endpoint* en linfoma folicular

La influencia de la duración de la respuesta al tratamiento de primera línea ha cobrado un gran interés de manera reciente. Varios estudios retrospectivos (Tabla 2) que incluyeron pacientes tratados con pautas de inducción de primera línea con rituximab en combinación con quimioterapia observaron fracaso precoz al tratamiento (definido en unos casos como refractariedad al tratamiento y en otros como POD24 o progresión en los 24 primeros meses desde el diagnóstico) en un 15-20% de los pacientes y dicho fracaso se asoció con una supervivencia claramente inferior a la de los pacientes que responden bien al tratamiento de primera línea. Así, en un estudio del *National LymphoCare Study*[22] se estimó en un 19% la prevalencia de pacientes que progresaban en los 2 primeros años desde el diagnóstico (POD24) en una serie de 588 pacientes tratados con la pauta R-CHOP (sin man-

tenimiento posterior) y esta progresión precoz se asociaba, entre otros factores, a la presencia de un FLIPI elevado. La probabilidad de SG a los 5 años fue de tan solo un 50%, significativamente inferior al 90% del resto de los pacientes (los que progresaban más allá de los 2 años), resultados similares a los de otro estudio con 94 pacientes[23]. En línea con estos resultados, un estudio canadiense con 132 pacientes[24] y otro español con 343 pacientes[25] encontraron prevalencias similares de fracaso precoz a la inmunoquimioterapia de primera línea o de progresión en los 6 primeros meses tras la inmunoquimioterapia de inducción (16,7% en el estudio canadiense y 15% en el español), concepto que en la bibliografía y en los ensayos clínicos se ha definido como refractariedad.

En dichos estudios también se observaron supervivencias significativamente inferiores en el grupo de los pacientes refractarios en comparación con los quimiosensibles (en el estudio canadiense, mediana de SG de tan solo 47 meses y en el español una SG a 5 años del 38% –en el grupo de refractarios– *vs*. 87% –en el resto–). El FLIPI elevado fue, de nuevo, uno de los factores pronósticos asociados con dicha refractariedad en ambos estudios, aunque en el estudio español[25] también la sintomatología B y la elevación de la beta-2 microglobulina sérica se relacionaron con refractariedad. Un hallazgo interesante de estos 2 últimos estudios fue una probabilidad significativamente mayor de transformación histológica a linfoma de alto grado en el grupo de pacientes refractarios respecto al grupo de pacientes quimiosensibles (en el estudio español la probabilidad de transformación a 10 años demostrada mediante biopsia fue del 16% en el grupo de refractarios en comparación con el 9% en el de no refractarios; p = 0,02). Adicionalmente, en el estudio español[25] se constató que los pacientes refractarios tenían asimismo una mayor probabilidad de refractariedad al tratamiento de rescate basado en quimioterapia o inmunoquimioterapia convencional, con o sin rituximab.

Por todo ello, este grupo de pacientes con LF refractarios a inmunoquimioterapia basada en rituximab o con progresión precoz (POD24) constituye sin duda un grupo de especial mal pronóstico y, por tanto, de alto riesgo, lo que ha llevado a considerar esta variable como un poderoso *endpoint* subrogado para la SG en pacientes con LF, como ha acabado de demostrar el estudio del Grupo *FLASH*[26]. Dicho estudio recogió datos de 5.453 pacientes procedentes de 13 ensayos clínicos y encontró POD24 en un 29% de los pacientes y un 2,5% adicional de mortalidad en los 2 primeros años no asociada con progresión. De nuevo, en el análisis multivariante los factores asociados con POD24 y muerte en los 2 primeros años fueron el sexo masculino, el ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) ≥ 2, el FLIPI entre 3 y 5 y un valor de beta-2 microglobulina sérica ≥ 3 mg/L. Tras ajustar por género y estratificación por ECOG y FLIPI, la POD24 se asoció con peor SG (HR: 5,24; IC 95%: 4,63-5,93; p < 0,01).

Dado que los factores pronósticos convencionales no identifican en la práctica clínica a este grupo de pacientes, se han realizado investigaciones encaminadas a la búsqueda de nuevos factores pronósticos que permitan su identificación, con la finalidad última de poder ofrecer a este grupo de LF un tratamiento diferenciado del resto de los pacientes.

En este sentido, algunos trabajos recientes han señalado que determinadas alteraciones genéticas (detectadas por estudios de secuenciación o por perfiles de expresión génica) tanto de las células tumorales como del microambiente del LF se relacionan con el pronóstico[27-29] e, incluso, en alguno de estos estudios[29] se sugiere un nuevo índice pronóstico, denominado POD24-PI (que incluye además del FLIPI de alto riesgo, el estado mutacional de EP300, FOX01 y EZH2), que a juicio de sus autores podría ayudar en la identificación de los pacientes POD24. Dada la ausencia en la práctica clínica diaria de factores útiles que permitan una identificación precoz de estos pacientes de alto riesgo de fracaso precoz al tratamiento, las únicas estrategias posibles de cara a minimizar su impacto pronóstico radicarían, por una parte, en un tratamiento eficaz de rescate, o en la incorporación de estrategias más eficaces que la combinación de rituximab-quimioterapia. En relación con este último punto, un subanálisis del estudio *GALLIUM* recientemente publicado[30] describió una reducción relativa del riesgo de POD24 del 46% (IC 95%: 25-61,1) en pacientes tratados con obinutuzumab-quimioterapia seguida de mantenimiento con obinutuzumab (9,5% de eventos de POD24 en el grupo de 601 pacientes tratados con obinutuzumab) respecto al grupo de rituximab-quimioterapia seguida de mantenimiento con rituximab (16,3% de eventos de POD24 en 601 pacientes tratados con rituximab).

En lo que respecta al tratamiento de rescate de los pacientes refractarios o con POD24, en los últimos años ha surgido un gran número de nuevas molécu-

las cuyos resultados han demostrado una mejoría en su pronóstico.

› Conclusiones

El LF es un linfoma frecuente cuyo pronóstico ha mejorado considerablemente desde la introducción de los anticuerpos monoclonales anti-CD20. Ninguno de los factores pronósticos utilizados habitualmente en la práctica clínica es de utilidad a la hora de decidir el tratamiento más adecuado para un paciente concreto o para predecir la respuesta a este.

En los últimos años, varios factores postratamiento relacionados con la respuesta han demostrado un peso importante en el pronóstico de los pacientes con LF, con influencia en los resultados clínicos a corto y largo plazo. La calidad y la profundidad de la respuesta, determinadas por técnicas sensibles como la EMR, han demostrado su relación independiente con SLP y SG en pacientes con LF tratados con inmunoquimioterapia basada en rituximab u obinutuzumab tanto tras el tratamiento de primera línea como en la recaída.

Por otra parte, entre un 15 y un 20% de los pacientes con LF fracasan de manera precoz a la inmunoquimioterapia, lo que se ha asociado con una disminución significativa en su supervivencia y mayor probabilidad de transformación histológica y de fracaso a los tratamientos convencionales de rescate. Ello ha motivado de manera reciente la búsqueda de nuevos factores pronósticos para su identificación precoz y para el desarrollo de terapias específicas dirigidas para estos grupos de alto riesgo.

› Bibliografía

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th ed. Lyon, France: IARC; 2017.
2. López-Guillermo A, Bosch F. Linfomas y otras enfermedades ganglionares. En: Farreras-Rozman Medicina Interna. 17.ª ed. Barcelona: Elsevier; 2012. pp. 1601-19.
3. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. Blood. 2010 Nov 11;116(19):3724-34.
4. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, Schmitz N, Lengfelder E, Schmits R, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. Blood. 2005 Dec 1;106(12):3725-32.
5. Marcus R, Imrie K, Solal-Celigny P, Catalano JV, Dmoszynska A, Raposo JC, et al. Phase III study of R-CVP compared with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone alone in patients with previously untreated advanced follicular lymphoma. J Clin Oncol. 2008 Oct 1;26(28):4579-86.
6. Herold M, Haas A, Srock S, Neser S, Al-Ali KH, Neubauer A, et al.; East German Study Group Hematology and Oncology Study. Rituximab added to first-line mitoxantrone, chlorambucil, and prednisolone chemotherapy followed by interferon maintenance prolongs survival in patients with advanced follicular lymphoma: an East German Study Group Hematology and Oncology Study. J Clin Oncol. 2007 May 20;25(15):1986-92.
7. Salles G, Mounier N, de Guibert S, Morschhauser F, Doyen C, Rossi JF, et al. Rituximab combined with chemotherapy and interferon in follicular lymphoma patients: results of the GELA-GOELAMS FL2000 study. Blood. 2008 Dec 15;112(13):4824-31.
8. Schulz H, Bohlius JF, Trelle S, Skoetz N, Reiser M, Kober T, et al. Immunochemotherapy with rituximab and overall survival in patients with indolent or mantle cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. J Natl Cancer Inst. 2007 May 2;99(9):706-14.
9. Marcus R, Davies A, Ando K, Klapper W, Opat S, Owen C, et al. Obinutuzumab for the First-Line Treatment of Follicular Lymphoma. N Eng J Med. 2017;377:1331-44.
10. Salles G, Seymour JF, Offner F, López-Guillermo A, Belada D, Xerri L, et al. Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomized controlled trial. Lancet. 2011 Jan 1;377(9759):42-51.
11. Salles G, Seymour JF, Feugier P, Offner F, López-Guillermo A, Belada D, et al. Long Term Follow-up of the PRIMA Study: Half of Patients Receiving Rituximab Maintenance Remain Progression Free at 10 Years. Blood. 2017;130:486.
12. Sorigué M, Sancho JM. Current prognostic and predictive factors in follicular lymphoma. Ann Hematol. 2018;97:209-27.
13. Bachy E, Brice P, Delarue R, Brousse N, Haioun C, Le Gouill S, et al. Long-term follow-up of patients with newly diagnosed follicular lymphoma in the prerituximab era: effect of response quality on survival--A study from the groupe d'etude des lymphomes de l'adulte. J Clin Oncol. 2010 Feb 10;28(5):822-9.
14. Lobetti-Bodoni C, Mantoan B, Monitillo L, Genuardi E, Drandi D, Barbero D, et al. Clinical implications and prognostic role of minimal residual disease detection in follicular lymphoma. Ther Adv Hematol. 2013 Jun;4(3):189-98.
15. Galimberti S, Luminari S, Ciabatti E, Grassi S, Guerrini F, Dondi A, et al. Minimal residual disease after conventional treatment significantly impacts on progression-free survival of patients with follicular lymphoma: The FIL FOLL05 Trial. Clin Cancer Res. 2014 Dec 15;20(24):6398-405.
16. Rambaldi A, Carlotti E, Oldani E, Della Starza I, Baccarani M, Cortelazzo S, et

al. Quantitative PCR of bone marrow BCL2/IgH+ cells at diagnosis predicts treatment response and long-term outcome in follicular non-Hodgkin lymphoma. Blood. 2005;105:3428-33.

17. Van Oers MHJ, Tönnissen E, Van Glabbeke M, Giurgea L, Jansen JH, Klasa R, et al. BCL-2/IgH polymerase chain reaction status at the end of induction treatment is not predictive for progression-free survival in relapsed/resistant follicular lymphoma: Results of a prospective randomized EORTC 20981 phase III intergroup study. J Clin Oncol. 2010 May 1;28(13):2246-52.
18. Ladetto M, Lobetti-Bodoni C, Mantoan B, Ceccarelli M, Boccomini C, Genuardi E, et al. Persistence of minimal residual disease in bone marrow predicts outcome in follicular lymphomas treated with a rituximab-intensive program. Blood. 2013;122:3759-66.
19. Pott C, Hoster E, Kehden B, Unterhalt M, Herold M, van der Jagt R, et al. Minimal Residual Disease Response at End of Induction and during Maintenance Correlates with Updated Outcome in the Phase III GALLIUM Study of Obinutuzumab- or Rituximab-Based Immunochemotherapy in Previously Untreated Follicular Lymphoma Patients. Blood. 2018;132:396.
20. Ladetto M, De Marco F, Benedetti F, Vitolo U, Patti C, Rambaldi A, et al.; Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO); Intergruppo Italiano Linfomi (IIL). Prospective, multicenter randomized GITMO/IIL trial comparing intensive (R-HDS) versus conventional (CHOP-R) chemoimmunotherapy in high-risk follicular lymphoma at diagnosis: the superior disease control of R-HDS does not translate into an overall survival advantage. Blood. 2008;111:4004-13.
21. Zohren F, Bruns I, Pechtel S, Schroeder T, Fenk R, Czibere A, et al. Prognostic value of circulating Bcl-2/IgH levels in patients with follicular lymphoma receiving first-line immunochemotherapy. Blood. 2015;126:1407-14.
22. Casulo C, Byrtek M, Dawson KL, Zhou X, Farber CM, Flowers CR, et al. Early Relapse of Follicular Lymphoma After Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Defines Patients at High Risk for Death: an Analysis From the National LymphoCare Study. J Clin Oncol. 2015 Aug 10;33(23):2516-22.
23. Murakami S, Kato H, Higuchi Y, Yamamoto K, Yamamoto H, Saito T, et al. Prediction of high risk for death in patients with follicular lymphoma receiving rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in first-line chemotherapy. Ann Hematol. 2016 Aug;95(8):1259-69.
24. Mozessohn L, Cheung MC, Crump M, Buckstein R, Berinstein N, Imrie K, et al. Chemoimmunotherapy resistant follicular lymphoma: predictors of resistance, association with transformation and prognosis. Leuk Lymphoma. 2014 Nov;55(11):2502-7.
25. Sorigue M, Mercadal S, Alonso S, Fernández-Álvarez R, García O, Moreno M, et al. Refractoriness to immunochemotherapy in follicular lymphoma: Predictive factors and outcome. Hematol Oncol. 2017 Dec;35(4):520-7.
26. Casulo C, Le-Rademacher J, Dixon J, Salles G, Hoster E, Herold M, et al. Validation of POD24 As a Robust Early Clinical Endpoint of Poor Survival in Follicular Lymphoma: Results from the Follicular Lymphoma Analysis of Surrogacy Hypothesis (FLASH) Investigation Using Individual Data from 5,453 Patients on 13 Clinical Trials. Blood. 2017;130:412.
27. Pastore A, Jurinovic V, Kridel R, Hoster E, Staiger AM, Szczepanowski M, et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. Lancet Oncol. 2015 Sep;16(9):1111-22.
28. Kridel R, Chan FC, Mottok A, Boyle M, Farinha P, Tan K, et al. Histological Transformation and Progression in Follicular Lymphoma: a Clonal Evolution Study. PLoS Med. 2016 Dec 13;13(12):e1002197.
29. Jurinovic V, Kridel R, Staiger AM, Szczepanowski M, Horn H, Dreyling MH, et al. Clinicogenetic risk models predict early progression of follicular lymphoma after first-line immunochemotherapy. Blood. 2016;128:1112-20.
30. Seymour, Marcus R, Davies A, Gallop-Evans E, Grigg A, Haynes A, et al. Association of early disease progression and very poor survival in the GALLIUM study in follicular lymphoma: benefit of obinutuzumab in reducing the rate of early progression. Haematologica. 2019 Jun;104(6):1202-8.

Nuevos tratamientos de primera línea en el linfoma folicular: ¿podemos realizar un tratamiento personalizado?

Miguel Ángel Canales Albendea
Servicio de Hematología, Hospital Universitario La Paz, Madrid

El linfoma folicular (LF) es una enfermedad heterogénea, en la que no existe tratamiento estándar de primera línea, por lo que el manejo inicial de los pacientes con LF continúa siendo un reto. Las diferentes opciones terapéuticas disponibles en la actualidad han convertido la toma de decisiones en un proceso complejo en el que se deben considerar no solo los beneficios, sino también los efectos adversos de las mismas. En este contexto, es difícil asegurar que una estrategia sea mejor que otra y queda por demostrar que una determinada terapia inicial o una secuencia concreta de tratamientos sea superior a otra, si definimos como superior mayor supervivencia global (SG). Por tanto, el reto actual es diseñar la estrategia terapéutica óptima en cada caso concreto, en función de las características basales tanto del paciente como de la enfermedad.

En este sentido, hay varios modelos pronósticos, basados en variables clínicas, que estratifican a los pacientes en diferentes grupos de riesgo, con diferente supervivencia libre de progresión (SLP) y SG (Tabla 1)[1-3]. El FLIPI, el índice clínico más ampliamente aceptado, ha sido validado en estudios prospectivos y en pacientes tratados con rituximab, pero no se utiliza habitualmente para la toma de decisiones terapéuticas. Además, ni FLIPI ni FLIPI2 son capaces de identificar al diagnóstico a los pacientes de mayor riesgo, definidos por la presencia de enfermedad refractaria, recaída precoz y transformación histológica. Por otro lado, los índices clínico-biológicos como el m7-FLIPI son difíciles de incorporar a la práctica clínica habitual.

Tabla 1. Identificación de pacientes de alto riesgo con los índices pronósticos clínicos

	Definición de alto riesgo	Pacientes, %	SLP 5a, %	SG 5a, %
FLIPI	3-5 FR	28	–	53
FLIPI2	3-5 FR	27	19	59
PRIMA-PI	β2m > 3 mg/L	32	37	81

5a: 5 años; FLIPI: Follicular Lymphoma International Prognostic Index; FR: factores de riesgo; PRIMA-PI: PRIMA Prognostic Index; SG: supervivencia global; SLP: supervivencia libre de progresión

Por tanto, la decisión terapéutica inicial se basa en la presencia de síntomas y en la carga tumoral de acuerdo con los criterios de los grupos francés (GELF) o británico (BNLI)[4,5]. En aquellos pacientes asintomáticos, con baja carga tumoral, la opción de esperar y ver sigue siendo válida en la actualidad, dado que ninguna de las opciones terapéuticas analizadas hasta el momento ha demostrado beneficio en SG[5,6]. Por el contrario, en pacientes con elevada carga tumoral la inmunoquimioterapia con rituximab es la opción inicial, pero no existe consenso sobre el mejor esquema de quimioterapia o el papel del mantenimiento.

En definitiva, la elección terapéutica es compleja para cada paciente concreto, de modo que, de acuerdo con la evidencia actualmente disponible, es posible tener en cuenta las siguientes consideraciones sobre la primera línea de tratamiento del LF:

1. La combinación de rituximab con CHOP, CVP o regímenes con fludarabina se asocia con una SG a los 8 años en torno al 80%, sin observar diferencias entre los diferentes esquemas. Sin embargo, aquellos pacientes tratados con CVP tienen un 43% más de posibilidades de requerir terapia de rescate, dado el mayor riesgo de progresión[7]. Además, R-CHOP se asocia a mejores resultados en pacientes con factores pronósticos adversos (FLIPI ≥ 3)[8].
2. El beneficio de la combinación de rituximab con bendamustina (RB) no se ha confirmado en pacientes con LF de grado 3a ni en el subgrupo de pacientes con FLIPI de alto riesgo[9].
3. El mantenimiento con rituximab ha prolongado la SLP y el tiempo hasta el siguiente tratamiento en

aquellos pacientes tratados inicialmente con CHOP, CVP o esquemas con fludarabina, de nuevo sin observar diferencias en SG[10]. Los datos recientemente actualizados del estudio *PRIMA* indican que la mitad de los pacientes no han progresado ni requerido otro tratamiento a los 10 años[11]. No existe, sin embargo, ningún estudio aleatorizado que confirme el beneficio del mantenimiento tras la administración de RB como tratamiento inicial.

4. La administración de obinutuzumab frente a rituximab en combinación con CHOP, CVP o bendamustina prolonga la SLP, sin diferencias en SG[12]. Análisis posteriores de este mismo estudio indican que dicho beneficio es mayor en pacientes con FLIPI de riesgo intermedio y alto riesgo, y que obinutuzumab reduce el riesgo de progresión precoz[13]. Además, la combinación de obinutuzumab con CHOP y CVP mejora la proporción de respuestas moleculares[14]. Por otro lado, el riesgo de neutropenia y de reacciones infusionales es mayor con obinutuzumab, además de mayor toxicidad, en forma de infecciones y segundas neoplasias en pacientes tratados con bendamustina[12,14].

5. El empleo de esquemas libres de quimioterapia, como la combinación de rituximab con lenalidomida, no ha demostrado beneficio evidente sobre la inmunoquimioterapia considerando tanto la SLP como la SG[15].

› Bibliografía

1. Solal-Céligny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, et al. Follicular lymphoma international prognostic index. Blood. 2004;104:1258-65.
2. Federico M, Bellei M, Marcheselli L, Luminari S, López-Guillermo A, Vitolo U, et al. Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project. J Clin Oncol. 2009;27:4555-62.
3. Bachy E, Maurer MJ, Habermann TM, Gelas-Dore B, Maucort-Boulch D, Estell JA, et al. A simplified scoring system in de novo follicular lymphoma treated initially with immunochemotherapy. Blood. 2018;132:49-58.
4. Brice P, Bastion Y, Lepage E, Brousse N, Haioun C, Moreau P, et al. Comparison in low-tumor-burden follicular lymphomas between an initial no-treatment policy, prednimustine, or interferon alfa: a randomized study from the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. J Clin Oncol. 1997;15:1110-7.
5. Ardeshna KM, Smith P, Norton A, Hancock BW, Hoskin PJ, MacLennan KA, et al. Long-term effect of a watch and wait policy versus immediate systemic treatment for asymptomatic advanced-stage non-Hodgkin lymphoma: a randomised controlled trial. Lancet. 2003;362:516-22.
6. Ardeshna KM, Qian W, Smith P, Braganca N, Lowry L, Patrick P, et al. Rituximab versus a watch-and-wait approach in patients with advanced-stage, asymptomatic, non-bulky follicular lymphoma: an open-label randomised phase 3 trial. Lancet Oncol. 2014;15:424-35.
7. Luminari S, Ferrari A, Manni M, Dondi A, Chiarenza A, Merli F, et al. Long-Term Results of the FOLL05 Trial Comparing R-CVP Versus R-CHOP Versus R-FM for the Initial Treatment of Patients With Advanced-Stage Symptomatic Follicular Lymphoma. J Clin Oncol. 2018;36:689-96.
8. Nastoupil LJ, Sinha R, Byrtek M, Ziemiecki R, Taylor M, Friedberg JW, et al. Comparison of the effectiveness of frontline chemoimmunotherapy regimens for follicular lymphoma used in the United States. Leuk Lymphoma. 2015;56:1295-302.
9. Rummel MJ, Niederle N, Maschmeyer G, Banat GA, Grünhagen von U, Losem C, et al. Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. Lancet. 2013;381:1203-10.
10. Salles G, Seymour JF, Offner F, López-Guillermo A, Belada D, Xerri L, et al. Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial. Lancet. 2011;377:42-51.
11. Salles GA, Seymour JF, Feugier P, Offner F, López-Guillermo A, Belada D, et al. Long Term Follow-up of the PRIMA Study: Half of Patients Receiving Rituximab Maintenance Remain Progression Free at 10 Years. Blood. 2017;130(Suppl. 1):486-6.
12. Marcus R, Davies A, Ando K, Klapper W, Opat S, Owen C, et al. Obinutuzumab for the First-Line Treatment of Follicular Lymphoma. N Engl J Med. 2017;377:1331-44.
13. Seymour JF, Marcus R, Davies A, Gallop-Evans E, Grigg A, Haynes A, et al. Association of early disease progression and very poor survival in the GALLIUM study in follicular lymphoma: benefit of obinutuzumab in reducing the rate of early progression. Haematologica. 2019 Jun;104(6):1202-8.
14. Hiddemann W, Barbui AM, Canales MA, Cannell PK, Collins GP, Dürig J, et al. Immunochemotherapy With Obinutuzumab or Rituximab for Previously Untreated Follicular Lymphoma in the GALLIUM Study: Influence of Chemotherapy on Efficacy and Safety. J Clin Oncol. 2018;36:2395-404.
15. Morschhauser F, Fowler NH, Feugier P, Bouabdallah R, Tilly H, Palomba ML, et al. Rituximab plus Lenalidomide in Advanced Untreated Follicular Lymphoma. N Engl J Med. 2018;379:934-47.

Tratamiento del linfoma folicular en recaída o refractario

Laura Magnano, Alfredo Rivas-Delgado, Armando López-Guillermo
Servicio de Hematología, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona

› Introducción

El linfoma folicular (LF) es una neoplasia linfoide B compuesta de linfocitos B que muestran atributos morfológicos, inmunofenotípicos y moleculares de las células del centro germinal de las cuales se origina. Es el segundo subtipo más frecuente de linfoma no Hodgkin en Europa occidental y representa alrededor de la cuarta parte de todos ellos. Afecta predominantemente a adultos con una mediana de edad de 60 años. Es una enfermedad bien caracterizada desde el punto de vista biológico y es el paradigma de linfoma indolente. Desde un punto de vista clínico, el LF se caracteriza por una evolución indolente, con una mediana de supervivencia muy prolongada que, aunque clásicamente se cifraba en unos 10 años de promedio, en la última década ha experimentado una clara mejoría, debido con toda probabilidad a las nuevas modalidades terapéuticas que incluyen la introducción del rituximab en el arsenal terapéutico de este linfoma[1]. Así, en la actualidad, tal mediana se acerca a los 20 años[1]. A pesar de la prolongada supervivencia global (SG) de estos enfermos, la curación es aún difícil y para los pacientes en estadio avanzado, que son la mayoría, virtualmente imposible. Aunque con los tratamientos actuales una elevada proporción de enfermos alcanza una respuesta completa (RC), la mayoría acaba recayendo, sin que se observe una meseta en la curva de supervivencia libre de progresión (SLP) por lo que, hoy por hoy, el LF se considera una enfermedad incurable en la mayor parte de los casos. La mediana de duración de la SLP es de 4-5 años tras el tratamiento con inmunoquimioterapias como R-CHOP, R-CVP o R-bendamustina[2-4]. El estudio *PRIMA* demostró que el mantenimiento con rituximab retrasa la progresión de la enfermedad, con una SLP a los 10 años de aproximadamente el 50%[5].

En el presente resumen se describirá la situación de los pacientes con LF recaídos o refractarios con las principales opciones terapéuticas en la actualidad.

› Linfoma folicular en recaída o refractario: pronóstico y terapia de rescate

Ante la sospecha de recaída, se recomienda (siempre que sea posible) realizar una nueva biopsia tisular para descartar una transformación histológica a un linfoma agresivo, ya que esto cambiaría el pronóstico y la actitud terapéutica. La toma de biopsia guiada por una tomografía por emisión de positrones (PET)/tomografía axial computarizada (TAC) podría aumentar el rendimiento de la misma.

Los factores pronósticos en la recaída/progresión son, por un lado, los mismos que al diagnóstico, entre ellos los índices pronósticos ya conocidos (Follicular Lymphoma International Prognostic Index –FLIPI– 1 y FLIPI 2). Por otro lado, la duración de la respuesta es fundamental. Así, se ha observado que los pacientes que logran una RC tras la inducción y la mantienen más allá de los 24[6] o 30 meses[7] tienen un pronóstico especialmente bueno, con una supervivencia similar a la población general. Ello no significa que el riesgo de recaída no siga siendo elevado. En todo caso, existen 2 grupos de pacientes que muestran una evolución especialmente mala y son aquellos que recaen de forma temprana (durante los primeros 2 años del tratamiento de primera línea con inmunoquimioterapia)[8] o aquellos que desarrollan una transformación histológica a un linfoma de alto grado[9]. Estos últimos son tributarios de tratamiento de linfoma agresivo. Cuando un paciente recae, la probabilidad de alcanzar una nueva respuesta es inferior a la inicial y, si la alcanza, la duración de esta será también menor.

El tratamiento al momento de la recaída depende del régimen que recibió el paciente en primera línea y de la duración de la remisión. Como al diagnóstico, la observación es una opción en pacientes asintomáticos con baja carga tumoral. Para pacientes con baja carga tumoral pero sintomáticos, el rituximab en monoterapia podría ser una opción razonable. En pacientes con alta carga tumoral y, por

Tabla 1. Nuevos fármacos para el tratamiento del linfoma folicular

		Diana terapéutica	Agentes
Inmunoterapia	Anticuerpos monoclonales	CD20 CD37	Rituximab*, ofatumumab, obinutuzumab*, ocaratuzumab, ublituximab Otlertuzumab, BI 836826
	Anticuerpos biespecíficos	CD3/CD19 CD3/CD20	Blinatumomab, AFM11 BTCT4465A, REGN1979
	Anticuerpos conjugados	CD22 CD79b CD19 CD37 CD19/CD22	Inotuzumab ozogamicina Polatuzumab vedotina Coltuximab ravtansina, ADCT-402 IMGN529, AGS67E DT2219ARL
	Terapia celular	CD19 CD20 CD22	CAR-T
Vías de señalización/ Epigenética	Inhibidores del BCR	BTK PI3K Syk	Ibrutinib, acalabrutinib, ONO/GS-4059 Idelalisib*, duvelalisib, copanlisib, umbralisib Entospletinib
	Inhibidores de BCL-2	BCL2	Venetoclax
	Inhibidores de MDM2	MDM2	Idasanutlin
	Inhibidores de NFκB	Proteosoma	Bortezomib
	Modificadores epigenéticos	EZH2	Tazemetostat, GSK2816126, CPI-1205
Microambiente tumoral	Agentes inmunomoduladores	Múltiples	Lenalidomida
	Inhibidores de *check-point*	PD-1 PD-L1	Nivolumab, pembrolizumab, pidilizumab Durvalumab, atezolizumab
	Otros agentes inmunomoduladores	CD47 CD137 KIR	TTI-621 Urelumab Lirilumab

* Aprobados para su uso clínico en España

tanto, con necesidad de tratamiento, este consistirá en inmunoquimioterapia (R-bendamustina, R-CHOP, R-CVP), que dependerá del tratamiento que haya recibido en primera línea. En general, se sugiere cambiar el régimen inicial. Es importante remarcar que la situación de recaída/progresión es la ideal para el uso de nuevos fármacos con diferentes mecanismos de acción. Como en otros tipos de linfomas y muchas otras neoplasias, en la última década se ha asistido al desarrollo de numerosos fármacos diferentes de la quimioterapia convencional, con mecanismos de acción más ajustados a la biología de la enfermedad y que, con toda probabilidad, van a suponer un cambio radical en el algoritmo terapéutico de estos enfermos. Sin embargo, dado que con los tratamientos disponibles en la actualidad los resultados de los pacientes con LF son francamente buenos, aunque sin proporcionar la curación de los mismos, hay que esperar a tener resultados sólidos antes de sustituir los fármacos tradicionales por los nuevos. En la Tabla 1 se indican algunos de los nuevos fármacos que se encuentran en fase de ensayo clínico en la actualidad. Aunque la clasificación es un tanto arbitraria, tales fármacos incluyen las moléculas pequeñas con acción específica sobre determinadas vías de señalización, los fármacos que actúan sobre el microambiente tumoral y diferentes tipos de inmunoterapia o terapia celular. A continuación, se detallarán algunos de los más importantes en LF.

› *Moléculas pequeñas con acción específica/epigenética*

En el capítulo de las moléculas pequeñas con acción específica, existen numerosas vías de señalización que pueden ser inhibidas, entre las que destacan la del BCR (que incluye genes diana como *BTK*, *PI3K*, *syk*, etc.), *BCL2*, *NFκB*, etc. Entre ellos, hay que desta-

Tabla 2. Resultados de nuevos fármacos en linfoma folicular

Tratamiento	Mecanismo	Respuestas globales	Respuestas completas	SLP mediana	Referencia
Ibrutinib	Inhibidor de BTK	31-37,5%	12,5%	1 año	Bartlet *et al.* 2018 Gopal *et al.* 2018
Idelalisib		56%		11 meses	Gopal *et al.* 2014 Gopal *et al.* 2017
Tazemetostat	Inhibidor de *EZH2*	74% (*EZH2* mutados) 34% (*EZH2* no mutados)	10% (*EZH2* mutados) 6% (*EZH2* no mutados)	60 semanas (*EZH2* mutados) 24 semanas (*EZH2* no mutados)	Morschhauser *et al.* 15-ICML abstract #105, 2019
Lenalidomida	Inmunomodulador	75%	32%	1,2-2 años	Leonard *et al.* 2019
Polatuzumab vedotina	Anti-CD79b	75%	ND	ND	Advani *et al.* 2015
Venetoclax	Inhibidor de *BCL2*	38%	ND	11 meses	Davis *et al.* 2017
Nivolumab	Anti-PD1	40%	ND	ND	Lesokhin *et al.* 2016

BTK: tirosina cinasa de Bruton; ND: no disponible; SLP: supervivencia libre de progresión

car un inhibidor de clase delta de PI3K, el idelalisib, fármaco formalmente aprobado por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) en pacientes con LF que han presentado al menos 3 recaídas. En efecto, la actividad de idelalisib es notable para este tipo de pacientes, en particular para los dobles refractarios a rituximab y alquilantes. Es importante tener en cuenta la toxicidad asociada a este tratamiento (principalmente en forma de pneumonitis) y hacer las profilaxis infecciosas oportunas (*Pneumocystis jirovecii*), así como monitorizar el citomegalovirus. Otros inhibidores de PI3K como copanlisib y duvelisib tienen eficacia similar en pacientes dobles refractarios y recientemente la Food and Drug Administration (FDA) ha aprobado su uso luego de al menos 2 líneas de tratamiento. El ibrutinib, un inhibidor de BTK, ha sido probado en LF con resultados modestos (Tabla 2). El tazemetostat, el primer inhibidor oral de *EZH2*, ha demostrado buena tolerancia e índices de respuesta globales muy prometedoras en monoterapia en ensayos en fase precoz. Como era de esperar, los resultados fueron particularmente favorables en pacientes mutados para el gen *EZH2*. Finalmente, son numerosos los estudios en los que se están ensayando diferentes combinaciones de estos fármacos asociados en algún caso a terapias convencionales.

› *Fármacos con acción sobre el microambiente tumoral*

En los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento del papel que desempeña el microambiente en el LF. Diferentes moléculas con efecto inmunomodulador por distintos mecanismos han demostrado eficacia frente al LF; entre ellas, cabe destacar la lenalidomida que, combinada con rituximab, ha demostrado importante actividad en LF recaído (Tabla 2), lo que es especialmente relevante dados los magníficos resultados también en primera línea.

› *Inmunoterapia*

Respecto a la inmunoterapia, hay que distinguir los tratamientos activos, como las vacunas, de la inmunoterapia pasiva. Los anticuerpos monoclonales son los más utilizados, con diferentes especificidades antigénicas: anti-CD20 (de diferentes tipos), pero también frente a otros antígenos y, en algunos casos, biespecíficos. Un grupo particular de enfermos son aquellos que se consideran refractarios al rituximab (recaídos durante el tratamiento con este fármaco o hasta 6 meses desde la última dosis). Recientemente, hay datos que indican que obinutuzumab sería útil en estos casos. Así, en un ensayo clínico se ha demostrado para pacientes refractarios a rituximab que la combinación obinutuzumab-bendamustina seguida de mantenimiento con obinutuzumab sería más eficaz que la bendamustina en monoterapia, con diferencias en la SG de los pacientes, lo que le ha valido la indicación formal a la combinación[10]. El polatuzumab vedotina, un anti-CD79b conjugado con monometil auristatina E, es un inhibidor de microtúbulo que no ha demostrado resultados alentadores en un ensayo aleatorizado de fase 2. En la Tabla 2 se muestran los resultados de algunos de estos fármacos nuevos en LF.

Más recientemente, la inmunoterapia con linfocitos T modificados (CART19) representa una herramienta terapéutica con grandes posibilidades para pacientes refractarios a otras terapias[11].

› Intensificación o mantenimiento tras el tratamiento de rescate

› *Papel del trasplante en el linfoma folicular recaído/refractario*

Existe un solo ensayo aleatorizado llevado a cabo en la era previa al rituximab y con pocos pacientes, que mostró beneficio tanto en términos de SLP como de SG en pacientes con LF recaído que recibieron un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TAPH) en comparación con aquellos que recibieron solo quimioterapia convencional, mientras que son numerosos los estudios en fase 2. Pese a los datos limitados, el TAPH se convirtió en una opción popular para pacientes con LF recaído de alto riesgo. El impacto del tratamiento previo con rituximab en los resultados del TAPH en pacientes con LF fue analizado en un estudio del European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Los autores observaron que los pacientes que habían recibido rituximab antes del TAPH (un tercio de la serie) no presentaban peores resultados en cuanto a índice de recaída, supervivencia libre de evento y SG[12]. El papel del TAPH en el LF ha sido siempre controvertido y difícil de definir. El principal argumento de los detractores es que, aunque prolonga la SLP, la mayoría de los pacientes acaba recayendo, por lo que no se trata de un tratamiento curativo. Sin embargo, este argumento se basa en estudios con un seguimiento corto que muestran una caída progresiva de las curvas de SLP. En estudios con un mayor seguimiento se ha observado una meseta en la curva de SLP, lo que para algunos sugiere que un grupo de pacientes con LF podría curarse con este tratamiento[13].

El advenimiento de terapias de inducción más eficaces, la introducción del rituximab de mantenimiento, así como la incorporación del rituximab en la terapia de rescate, hacen que muchos autores cuestionen el papel del TAPH en estos enfermos. En 2013 se publicó un documento de consenso, en el que un panel internacional de expertos en LF y en trasplante llegó al consenso de que el TAPH no está indicado en el tratamiento de primera línea fuera de ensayo clínico (ni siquiera en grupos de alto riesgo), pero que sí es una opción en primera o sucesivas recaídas quimiosensibles[14]. Parece claro también que el TAPH tiene un papel importante en pacientes con LF en primera recaída quimiosensible con factores de mal pronóstico (FLIPI alto) y especialmente en pacientes con una respuesta de corta duración (< 2-3 años) a la inmunoquimioterapia de inducción[15].

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) constituye también un ejemplo de inmunoterapia. El alo-TPH debe considerarse un tratamiento experimental en estos pacientes, aunque conceptualmente sería la única aproximación realmente curativa de la enfermedad. El alo-TPH con regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida debería considerarse en la recaída tras un TAPH. En un estudio del EBMT recientemente publicado que evaluó 1.567 pacientes con LF que recibieron un alo-TPH se observó una SG y una SLP a los 5 años del 61 y el 52%, respectivamente. En este estudio, el alo-TPH de intensidad reducida y en fases tempranas de la enfermedad mostró buenos resultados, con una mortalidad relacionada con el trasplante de 19%[16]. En la misma línea, otro estudio que comparó el TAPH y el alo-TPH en pacientes con LF recaídos observó una mejor SG, de 87 *vs.* 61% ($p < 0,001$), para pacientes sometidos a TAPH y alo-TPH, respectivamente. Si bien en este estudio los pacientes sometidos a TAPH tuvieron mayor índice de recaída (32 *vs.* 16%), la mortalidad relacionada con el alo-TPH fue mayor (24 *vs.* 3% para alo-TPH *vs.* TAPH, respectivamente)[17]. Finalmente, el papel que tendrá el trasplante en la era de los nuevos tratamientos está pendiente de ser determinado.

› *Rituximab de mantenimiento en la recaída/refractariedad*

En la era pre-rituximab, en varios estudios y un metaanálisis posterior se observó que los pacientes que recibieron rituximab de mantenimiento (375 mg/m^2 cada 3 meses durante 2 años) tras el tratamiento de rescate mostraron mayor SLP y SG, aunque con un discreto incremento de los eventos adversos infecciosos[18]. El uso de mantenimiento en segunda línea en pacientes que han recibido mantenimiento en primera no está bien documentado, aunque se suele utilizar en la práctica clínica salvo en aquellos enfermos que han recaído durante la fase del mantenimiento.

› Tratamiento de pacientes en recaída/progresión precoz

Como se ha indicado anteriormente, el momento de la recaída impacta notablemente en el pronóstico de estos enfermos. Los pacientes que recaen de forma precoz (durante los 2 primeros años desde el tratamiento de primera línea con inmunoquimioterapia, llamados POD24) representan aproximadamente un 20% y muestran una SG significativamente acortada (alrededor del 50% a los 5 años en comparación con el 90% de los restantes)[8]. Estos datos han sido validados en otras series[6], por lo que la recaída precoz se ha convertido en un marcador robusto de mal pronóstico en el LF.

Las guías de la European Society for Medical Oncology (ESMO) recomiendan esquemas sin resistencia cruzada como bendamustina después de R-CHOP o viceversa. Otras opciones que podrían ser útiles incluyen regímenes basados en fludarabina, en platinos o en agentes alquilantes. El rituximab debe agregarse si el régimen previo que contenía rituximab logró una duración de la respuesta mayor a 6-12 meses[19]. Por otra parte, el obinutuzumab ha sido aprobado por la EMA para casos refractarios a rituximab en función de la mejor SLP cuando se comparó obinutuzumab-bendamustina con bendamustina sola. Una estrategia alternativa de tratamiento para pacientes con recaída precoz podrían ser los agentes inmunomoduladores como la lenalidomida, que ha demostrado actividad en LF recaído tanto en monoterapia como asociada a rituximab o a obinutuzumab (Tabla 2). La inhibición de PI3K también ha mostrado actividad en LF en recaída precoz. De hecho, un análisis *post hoc* de los pacientes tratados con idelalisib fue realizado para evaluar los resultados en pacientes con recaída precoz, observando la misma tasa de respuestas y SLP que en la serie global. Otros inhibidores de PI3K han mostrado similares resultados (Tabla 2).

En pacientes con buen estado general, menores de 65 años, se debería considerar consolidar la respuesta al tratamiento de rescate con un TAPH. Esta conducta se basa en los resultados de estudios retrospectivos o series de registro que sugieren un control duradero de la enfermedad con supervivencias globales que oscilan entre el 67 y el 80% en pacientes sometidos a TAPH[15]. Un estudio publicado recientemente ha comparado el TAPH con el alo-TPH de hermano compatible y de donante no emparentado en pacientes con LF que han presentado un fallo temprano al tratamiento (< 2 años), observando que la SG de ambos grupos fue similar (en torno al 70% a los 5 años) con una mortalidad relacionada con el trasplante más baja para pacientes sometidos a TAPH, aunque con un índice de recaída más bajo para pacientes sometidos a alo-TPH de hermano compatible[20]. Ya que este grupo de enfermos tiene un pronóstico especialmente malo, siempre que sea posible deberían incluirse en ensayos clínicos con nuevos fármacos. Finalmente, otra opción actualmente en estudio es la inmunoterapia con CART19 que, en este tipo histológico, debe todavía considerarse experimental.

› Conclusiones

Los pacientes con LF tienen en general un buen pronóstico en cuanto a la supervivencia, pero con alto riesgo de recaída. Cuando la recaída/progresión es precoz, el pronóstico es desfavorable. El arsenal terapéutico clásico (diferentes tipos de inmunoquimioterapia y eventualmente la intensificación mediante un TAPH) se ha visto mejorado con diferentes inmunoterapias y otros tratamientos diana del tipo de las moléculas pequeñas con acción específica.

› Bibliografía

1. Tan D, Horning SJ, Hoppe RT, Levy R, Rosenberg SA, Sigal BM, et al. Improvements in observed and relative survival in follicular grade 1-2 lymphoma during 4 decades: the Stanford University experience. Blood. 2013 Aug 8;122(6):981-7.
2. Flinn IW, van der Jagt R, Kahl BS, Wood P, Hawkins TE, Macdonald D, et al. Randomized trial of bendamustine-rituximab or R-CHOP/R-CVP in first-line treatment of indolent NHL or MCL: the BRIGHT study. Blood. 2014 May 8;123(19):2944-52.
3. Federico M, Luminari S, Dondi A, Tucci A, Vitolo U, Rigacci L, et al. R-CVP versus R-CHOP versus R-FM for the initial treatment of patients with advanced-stage follicular lymphoma: results of the FOLL05 trial conducted by the Fondazione Italiana Linfomi. J Clin Oncol. 2013 Apr 20;31(12):1506-13.
4. Rummel MJ, Niederle N, Maschmeyer G, Banat GA, von Grünhagen U, Losem C, et al. Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. Lancet. 2013 Apr 6;381(9873):1203-10.
5. Bachy E, Seymour JF, Feugier P, Offner F, López-Guillermo A, Belada D, et al. Sustained Progression-Free Survival Benefit of Rituximab Maintenance in Pa-

tients With Follicular Lymphoma: Long-Term Results of the PRIMA Study. J Clin Oncol. 2019 Jul 24:JCO1901073. [Epub ahead of print].

6. Maurer MJ, Bachy E, Ghesquières H, Ansell SM, Nowakowski GS, Thompson CA, et al. Early event status informs subsequent outcome in newly diagnosed follicular lymphoma. Am J Hematol. 2016 Nov;91(11):1096-101.
7. Magnano L, Alonso-Álvarez S, Alcoceba M, Rivas-Delgado A, Muntañola A, Nadeu F, et al.; Grupo Español de Linfomas y Trasplante Autólogo de Médula Ósea (GELTAMO). Life expectancy of follicular lymphoma patients in complete response at 30 months is similar to that of the Spanish general population. Br J Haematol. 2019 May;185(3):480-91.
8. Casulo C, Byrtek M, Dawson KL, Zhou X, Farber CM, Flowers CR, et al. Early Relapse of Follicular Lymphoma After Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Defines Patients at High Risk for Death: An Analysis From the National LymphoCare Study. J Clin Oncol. 2015 Aug 10;33(23):2516-22.
9. Federico M, Caballero Barrigón MD, Marcheselli L, Tarantino V, Manni M, Sarkozy C, et al. Rituximab and the risk of transformation of follicular lymphoma: a retrospective pooled analysis. Lancet Haematol. 2018 Aug;5(8):e359-e367.
10. Cheson BD, Chua N, Mayer J, Dueck G, Trněný M, Bouabdallah K, et al. Overall Survival Benefit in Patients With Rituximab-Refractory Indolent Non-Hodgkin Lymphoma Who Received Obinutuzumab Plus Bendamustine Induction and Obinutuzumab Maintenance in the GADOLIN Study. J Clin Oncol. 2018 Aug 1;36(22):2259-66.
11. Hirayama AK, Gauthier J, Hay KA, Voutsinas JM, Wu Q, Sheih A, et al. High rate of durable complete remission in follicular lymphoma after after CD19 CAR-T cell immunotherapy. Hematol Oncol. 2019;37:170-1.
12. El-Najjar I, Boumendil A, Luan JJ, Bouabdallah R, Thomson K, Mohty M, et al. The impact of total body irradiation on the outcome of patients with follicular lymphoma treated with autologous stem-cell transplantation in the modern era: a retrospective study of the EBMT Lymphoma Working Party. Ann Oncol. 2014 Nov;25(11):2224-9.
13. Montoto S, Canals C, Rohatiner AZ, Taghipour G, Sureda A, Schmitz N, et al. Long-term follow-up of high-dose treatment with autologous haematopoietic progenitor cell support in 693 patients with follicular lymphoma: an EBMT registry study. Leukemia. 2007 Nov;21(11):2324-31.
14. Montoto S, Corradini P, Dreyling M, Ghielmini M, Kimby E, López-Guillermo A, et al. Indications for hematopoietic stem cell transplantation in patients with follicular lymphoma: a consensus project of the EBMT-Lymphoma Working Party. Haematologica. 2013 Jul;98(7):1014-21.
15. Casulo C, Friedberg JW, Ahn KW, Flowers C, DiGilio A, Smith SM, et al. Autologous Transplantation in Follicular Lymphoma with Early Therapy Failure: a National LymphoCare Study and Center for International Blood and Marrow Transplant Research Analysis. Biol Blood Marrow Transplant. 2018 Jun;24(6):1163-71.
16. Sureda A, Zhang MJ, Dreger P, Carreras J, Fenske T, Finel H, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for relapsed follicular lymphoma: A combined analysis on behalf of the Lymphoma Working Party of the EBMT and the Lymphoma Committee of the CIBMTR. Cancer. 2018 Apr 15;124(8):1733-42.
17. Evens AM, Vanderplas A, LaCasce AS, Crosby AL, Nademanee AP, Kaminski MS, et al. Stem cell transplantation for follicular lymphoma relapsed/refractory after prior rituximab: a comprehensive analysis from the NCCN lymphoma outcomes project. Cancer. 2013 Oct 15;119(20):3662-71.
18. Vidal L, Gafter-Gvili A, Salles G, Dreyling MH, Ghielmini M, Hsu Schmitz SF, et al. Rituximab maintenance for the treatment of patients with follicular lymphoma: an updated systematic review and meta-analysis of randomized trials. J Natl Cancer Inst. 2011 Dec 7;103(23):1799-806.
19. Van Oers MH, Van Glabbeke M, Giurgea L, Klasa R, Marcus RE, Wolf M, et al. Rituximab maintenance treatment of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin's lymphoma: long-term outcome of the EORTC 20981 phase III randomized intergroup study. J Clin Oncol. 2010 Jun 10;28(17):2853-8.
20. Dreyling M, Ghielmini M, Rule S, Salles G, Vitolo U, Ladetto M; ESMO Guidelines Committee. Newly diagnosed and relapsed follicular lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2016;27(Suppl. 5):v83-90.
21. Smith SM, Godfrey J, Ahn KW, DiGilio A, Ahmed S, Agrawal V, et al. Autologous transplantation versus allogeneic transplantation in patients with follicular lymphoma experiencing early treatment failure. Cancer. 2018 Jun 15;124(12):2541-51.

MEDICAMENTOS INNOVADORES Y SOSTENIBILIDAD DEL SISTEMA SANITARIO

Coordinadores: **Dra. Concepción Herrera Arroyo.** Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba
Dr. Jesús María Hernández Rivas. Hospital Clínico Universitario de Salamanca

Los medicamentos innovadores y sostenibilidad del sistema sanitario: la visión de los hematólogos (el mieloma como modelo)

J. San Miguel[1], A. Santiago-Marí[2], J.J. Lahuerta[3]

[1] Clínica Universidad de Navarra, Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), Pamplona; [2] Fundación PETHEMA (Programa Español de Tratamientos en Hematología); [3] Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid

La mortalidad en el cáncer ha disminuido de forma constante en la última década debido a las medidas preventivas y al desarrollo de nuevos fármacos. De hecho, puede demostrarse una clara correlación entre el número de nuevos fármacos recientemente introducidos en el tratamiento de las distintas neoplasias y las ganancias en supervivencia. A la cabeza de esta correlación están algunas neoplasias hematológicas, como el linfoma o el mieloma múltiple (MM), que se han beneficiado del desarrollo de nuevas generaciones de fármacos con mayor eficacia y especificidad antitumoral, lo que ha permitido duplicar o triplicar la supervivencia de estos pacientes. No obstante, este aumento en la supervivencia es todavía inferior al observado en algunos tumores sólidos, como los carcinomas de mama o de próstata, en los cuales el desarrollo de programas de detección y, por tanto, de intervención terapéutica precoz han contribuido, junto a los nuevos fármacos, a una drástica reducción de la mortalidad.

Ante estas evidencias, ¿cómo vemos los investigadores a la industria farmacéutica en el campo del desarrollo de fármacos innovadores?, ¿son empresas que buscan fundamentalmente su beneficio o son socios en una batalla común? Reflejaría ignorancia o irresponsabilidad no reconocer tanto su contribución a los continuos avances, como las dificultades que tiene que afrontar la industria farmacéutica en el desarrollo de nuevos fármacos. Solo 1-2 de cada 10.000 nuevas moléculas que inician el camino de la investigación llegan a demostrar la eficacia que se requiere para justificar su comercialización y, por tanto, ofrecer retornos a la inversión realizada. Más aún, una buena parte de los ensayos clínicos no logran el objetivo perseguido. Por ejemplo, en el caso del melanoma, en el proceso del desarrollo de 7 nuevos fármacos, fracasaron hasta 96 ensayos clínicos en demostrar utilidad clínica. Por otra parte, es necesario resaltar que las exigencias de las normas que regulan el desarrollo de fármacos de uso humano implican controles muy superiores a los de otros productos industriales, como puede ser la fabricación de un coche o de un avión, por lo que los tiempos de desarrollo se incrementan desde 3-6 años en otros terrenos, incluso de vanguardia tecnológica, a los 10-12 años que exige la puesta a punto de las nuevas generaciones de fármacos. Hoy, el presupuesto necesario para el desarrollo de un nuevo fármaco se estima en 2.400 millones de euros, una inversión cuyo rendimiento está amenazado tanto por el tiempo de la duración de la patente como por el riesgo de la aparición de otras moléculas con mayor actividad en la misma patología. Además, es necesario reconocer el papel de la industria farmacéutica en la generación de empleo, tanto en puestos directos como indirectos.

Una consecuencia de los elevados costes relacionados tanto con la investigación biológica preclínica de alta complejidad, como con los desarrollos clínicos sometidos a controles regulatorios extremos son los precios, a veces desorbitados, de la mayoría de estos fármacos innovadores. Precios cuya cuantía *a priori* puede estar justificada por los factores arriba señalados, pero que, de una manera mimética se extrapola a otros fármacos basados en formulaciones desarrolladas hace décadas o que no exigieron inversiones importantes para su desarrollo, incrementándose el precio de forma no justificable. Estas razones, a veces lógicas, pero en ocasiones arbitrarias, hacen que los fármacos se sitúen a la cabeza de los incrementos de precios en comparación con otros productos industriales. Otra indeseable consecuencia del panorama actual, derivada de la potencial mayor rentabilidad de los fármacos oncológicos o de enfermedades autoinmunes, es el abandono de los desarrollos en otras áreas críticas de la medicina, aparentemente menos rentables, como es el caso de la antibioterapia, donde

el incremento de resistencias derivadas del uso masivo de antibióticos se enfrenta a una parada en la investigación, cuyas consecuencias, de persistir, pueden ser irreparables.

Centrémonos ahora en la labor de los hematólogos y de los grupos cooperativos en el desarrollo de medicamentos innovadores. Al igual que ocurre con las universidades, donde conjugar la docencia con la investigación eleva la calidad docente, también en la práctica médica, cuando la investigación se incluye como parte indisoluble del trabajo clínico, aumenta la calidad asistencial. En definitiva, nuestros médicos deben no solo estar al día, sino también contribuir al incremento del conocimiento, en la medida de lo posible.

En el campo de los medicamentos innovadores, la alianza con la industria es uno de los caminos obligados. Esta colaboración no solo conlleva participar en el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas para pacientes que en ocasiones carecen de otras alternativas, sino que a su vez los ensayos clínicos en fases tempranas aportan rigor a nuestros métodos de trabajo, permiten estar en primera línea del desarrollo y contribuir al conocimiento científico.

En los últimos 10 años, los ensayos clínicos desarrollados por la Fundación PETHEMA, a iniciativa de los investigadores, pero en imprescindible colaboración con la industria, legítima propietaria de las nuevas moléculas, han permitido tratar más de 3.000 pacientes de 90 centros hospitalarios. Un análisis más detallado de la inversión en estos ensayos refleja un ahorro por paciente para el sistema sanitario que puede llegar a cifras de entre 60.000 y 400.000 €. Además de la ventaja económica y de aportar nuevas opciones terapéuticas para nuestros pacientes, vale la pena destacar algunas de las contribuciones más relevantes derivadas del trabajo de los investigadores del Grupo Español de Mieloma (GEM), como por ejemplo el desarrollo y la aprobación del esquema VMP (primer avance significativo para pacientes con MM no candidatos a trasplante); la reducción de la toxicidad de este esquema a partir de la utilización de bortezomib semanal o el aumento de la eficacia al añadir daratumumab a dicho esquema; el incremento antitumoral al combinar inhibidores del proteasoma con inmunomoduladores tanto en pacientes mayores (VMP-Rd) como jóvenes (VRD); la estratificación del riesgo en pacientes con mieloma quiescente que facilitó la activación de un ensayo clínico pionero en pacientes de alto riesgo, demostrando que la intervención precoz reduce las transformaciones a MM sintomático y aumenta significativamente la supervivencia, lo cual además ha propiciado un cambio en los criterios de diagnóstico de MM activo. Finalmente, hay que destacar el trabajo y las aportaciones del GEM en la definición de la enfermedad mínima residual como un objetivo terapéutico, tras demostrar que este parámetro, relacionado directamente con la profundidad de la respuesta antitumoral, constituye el biomarcador pronóstico más importante, que probablemente guiará la duración de los ensayos clínicos y la aprobación precoz de fármacos innovadores.

Quizás el reto más difícil de nuestro tiempo es el de la sostenibilidad de los medicamentos innovadores y de los ensayos clínicos. Desde nuestro punto de vista, la sostenibilidad pasa por decisiones basadas en la consulta a los médicos especialistas, en este caso hematólogos, a los que corresponde la responsabilidad de las prescripciones basadas en un balance coste/eficacia razonable. Desafortunadamente, y a diferencia de otros países europeos, la implicación de los grupos cooperativos españoles en estas decisiones es marginal o inexistente. El segundo aspecto clave en la sostenibilidad es propiciar prescripciones basadas en un balance riguroso considerando, junto a los fármacos más innovadores, otras alternativas terapéuticas de similar eficacia y menor coste. En este campo, el papel de los fármacos genéricos y biosimilares puede ser clave, pero requiere una regulación que no vaya en detrimento de la inversión y, por tanto, de la innovación promovida por las empresas farmacéuticas pioneras en el desarrollo de nuevos productos. En tercer lugar, sería necesario promover estrategias de riesgo compartido, especialmente en medicamentos de alto coste o en tratamientos prolongados. Finalmente, sería conveniente fomentar guías clínicas estrictas que midan, prospectiva y retrospectivamente, el coste/beneficio, los años ganados de vida y las ventajas en calidad de vida.

Como ya hemos esbozado en los párrafos precedentes, la sostenibilidad pasa también por hacer posible el desarrollo de ensayos a iniciativa de los grupos cooperativos (en colaboración con la industria), dirigidos a obtener respuestas a preguntas de interés clínico diferentes del registro de indicaciones, objetivo fundamental de los ensayos promovidos directamente por las empresas farmacéuticas. Ejemplos de estos ensayos serían la búsqueda de tratamientos adapta-

dos a la respuesta o estrategias de intervención precoz con objetivo curativo; también el desarrollo de ensayos clínicos dirigidos a poblaciones concretas o bien orientados a definir la duración óptima de los tratamientos de mantenimiento en función de biomarcadores fiables, dado que en muchos casos los tratamientos indefinidos ni son lógicos desde el punto de vista científico ni son sostenibles a largo plazo desde una perspectiva económica.

Por último, es muy importante establecer que cualquier sistema sanitario que pretenda aunar la máxima calidad con la sostenibilidad del sistema debería apostar decididamente por ensayos independientes de la industria dirigidos a obtener soluciones para necesidades no cubiertas, incluyendo reducciones de costes con alternativas terapéuticas de similar eficacia, la eliminación de sesgos potencialmente presentes en algunos de los ensayos de la industria (por ejemplo, ausencia de pacientes con mal estado general, disfunción orgánica, etc.), incidir en la investigación de alternativas terapéuticas para indicaciones huérfanas (por ejemplo, infiltración del sistema nervioso central –SNC– en MM) o definir nuevos biomarcadores que permitan una medicina de mayor precisión. Es indudable que potenciar estos campos de investigación, que en último término descansan en el trabajo de médicos y otros profesionales del propio sistema sanitario, depende también de la concienciación y la iniciativa de los responsables últimos del propio sistema. Nuestra sociedad debe replantear las inversiones en investigación y desarrollo (I+D), pues cuesta aceptar que las agencias españolas de ciencia, en contraste con lo que ocurre en Francia o Alemania, tengan presupuestos muy por debajo de los de algunos clubes de fútbol. Por eso, es responsabilidad de todos lograr "la sostenibilidad de la máxima innovación", ya que tenemos la oportunidad de vivir una etapa apasionante del desarrollo médico, en la que el trabajo en equipo es imprescindible para asegurar un futuro sostenible.

Declaración de conflicto de intereses: JSM declara su participación en Advisory Boards con Amgen, BMS, Celgene, Janssen, MSD, Novartis, Takeda, Sanofi, Roche y Abbvie. JJL declara su participación en Advisory Boards con Amgen, Celgene, BMS, Janssen y Takeda.

GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

Coordinadores:

Dr. Miguel T. Hernández García. Hospital Universitario de Canarias, Santa Cruz de Tenerife

Dr. Javier de la Rubia Comos. Hospital Universitario Dr. Peset, Valencia

El grupo de entidades conocido como gammapatías monoclonales, en realidad un subgrupo de las enfermedades linfoproliferativas, es uno de los campos de la hematología que mayores cambios ha tenido en los últimos 20 años. Inicialmente originados en el mieloma múltiple, tras demostrarse la utilidad de la talidomida, estos avances diagnósticos y terapéuticos se han ido extendiendo al mieloma quiescente, la amiloidosis y la macroglobulinemia de Waldenström. Aun así, la realización de un diagnóstico correcto, en tiempo, y la decisión de cuál es el mejor tratamiento para cada paciente, siguen siendo unos de los grandes retos para la hematología actual.

Concretamente, en el campo del mieloma múltiple y antes del uso del melfalán, la supervivencia mediana de los pacientes era inferior a un año y las respuestas al tratamiento eran referidas como "respuestas subjetivas". Con la introducción de la combinación de melfalán y prednisona, terapia estándar durante casi 40 años, la supervivencia mediana aumentó a 3 años y ya a finales de los años sesenta y principios de los setenta grupos como la Chronic Leukemia-Myeloma Task Force (CLMTF) y el SWOG referenciaban las respuestas según el porcentaje de disminución de la proteína monoclonal (componente M). Con la llegada primero del trasplante hematopoyético y luego con los nuevos fármacos se hizo preciso definir las respuestas en función también de nuevos procedimientos diagnósticos, como la determinación de la enfermedad mínima residual (EMR) por *next-generation sequencing* (NGS) o *next generation flow* (NGF), esta última al alcance de muchos centros. La contribución de investigadores del Grupo Español de Mieloma en este campo ha sido muy importante, desde el artículo de consenso del European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT)/Autologus Blood and Marrow Transplant Registry (ABMTR)/International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR), que sentó las bases de los actuales criterios de respuesta, pasando por los estudios de validación, hasta la contribución de la EMR en la profundidad de la respuesta. De todo ello nos hablará el Dr. Lahuerta, conocedor de primera mano de la importancia de los criterios de respuesta, siguiendo una perspectiva histórica, de forma objetiva y –tan necesaria– crítica, de las diferentes propuestas de criterios de respuesta.

Sin embargo, y a pesar del gran avance que se ha producido en el tratamiento del mieloma en las 2 últimas décadas, la recaída es la norma y la enfermedad sigue considerándose incurable. Afortunadamente, el llamado "cuarto método" por el Dr. Georges Mathé (los otros para el tratamiento del cáncer en general eran la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia) ha resurgido con fuerza. El propio Dr. Mathé, uno de los pioneros en el trasplante hematopoyético, describió el efecto del injerto contra la leucemia en el trasplante de médula ósea, que es una forma de inmunoterapia, denominada por él "inmunoterapia adoptiva", efectiva y duradera (aunque con grandes riesgos), que ha supuesto y supone la posibilidad de curación de enfermedades hematológicas consideradas clásicamente como incurables. Cuarenta años después, la inmunoterapia ha regresado con fuerza, apoyada por resultados espectaculares. Es un tema complejo, con múltiples enfoques y que avanza vertiginosamente. La Dra. Paula Rodríguez Otero, con experiencia propia en este campo, nos hará un resumen ordenado de las diferentes modalidades de inmunoterapia, incluido el tratamiento con células CAR-T y su aplicación en el campo del mieloma.

La tercera y última ponencia versará sobre la macroglobulinemia de Waldenström, descrita por primera vez a mediados del siglo XX por el sueco Jan Waldenström. Curiosamente, en los setenta fue apodada la "enfermedad de los presidentes" porque varios mandatarios la padecieron (se cita a Pompidou –Francia–, Boumédiène –Argel–, Pahlaví –Irán– o Meir –Israel–). Es una enfermedad poco frecuente que generalmente afecta a pacientes mayores, sobre todo varones. Su curso clínico es característicamente indolente, siendo habitual que el enfermo lleve tiempo, con frecuencia años, con alguna alteración en el análisis, como un aumento de la velocidad de sedimentación globular (VSG), antes de su diagnóstico. El manejo de esta enfermedad comienza por conocer su clínica y su diagnóstico. La confirmación se sigue haciendo mediante aspirado y biopsia de médula ósea, pero actualmente realizaremos un inmunofenotipo y estudiaremos las mutaciones de MYD88 y CXCR4. El clásico tratamiento con clorambucilo fue desplazado, con excesivo entusiasmo, con la llegada de los análogos de las purinas. Posteriormente, la toxicidad de estos fármacos los ha relegado a casos previamente tratados que no dispongan de una opción menos tóxica. En la actualidad, los tratamientos de primera línea solo contemplan opciones menos agresivas. Nuevos fármacos han aparecido con fuerza, entre ellos el ibrutinib, y otros que exploran nuevas vías están en fase de estudio. De todo esto nos hablará el Dr. García Sanz, autoridad de prestigio internacional en este campo.

Mieloma Múltiple: más allá de la Remisión Completa

Juan José Lahuerta
Servicio de Hematología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid. Grupo Español de Mieloma. Fundación PETHEMA

› Respuesta y pronóstico. En la época de la quimioterapia

En la historia del Mieloma Múltiple (MM), el periodo que transcurre entre la demostración del efecto positivo de melfalán-prednisona en aproximadamente el 35% de los pacientes con MM y los primeros resultados con quimioterapia a alta dosis soportada por trasplante autólogo constituye una época oscura caracterizada por el fracaso de todos los intentos de mejorar los resultados iniciales[1]. Durante este largo periodo, en las clasificaciones de la respuesta (criterios Chronic Leukemia & Myeloma Task Force, SWOG Network, Medical Research Council y otros), la reducción de la banda Monoclonal (M) entre el 50 y el 75% constituían la máxima respuesta a la que era posible aspirar. Más tarde se estableció como objetivo del tratamiento alcanzar una fase de respuesta parcial estable que se denominó *plateau*[2]. Estos criterios, debido a las reticencias de algunos grupos y líderes de opinión sobre la eficacia del trasplante autólogo, fueron utilizados hasta bien avanzada la década de los noventa e incluso en algunos casos hasta los primeros años del siglo actual[3].

› Remisión Completa y Trasplante Autólogo

Históricamente, el concepto de remisión completa (RC) está ligado al uso de melfalán a altas dosis soportado con trasplante autólogo, entonces de médula ósea (MO). En la que probablemente es la primera publicación que describe un trasplante autólogo en MM, en 1983, 9 pacientes con MM del Hospital Royal Marsden[4] fueron tratados con melfalán entre 100 y 140 mg/m^2 seguido de un trasplante autólogo de MO; 3 de los 5 casos previamente no tratados consiguieron RC, iniciándose una nueva etapa fundamental en la historia del tratamiento del MM. En la interpretación de las Remisiones Completas (RC) de los 90, hay que tener en cuenta que la definición inicial de RC se basó en la negativización del trazado electroforético (EEF); por eso, estas respuestas no serían asimilables a los criterios actuales de RC. Este criterio de RC fue aplicado en la descripción de los resultados del ensayo clínico fase III desarrollado por el Intergroupe Français du Myélome (IFM) entre 1990 y 1993[5], probablemente el más importante de la década en MM, ya que logró demostrar en términos de Supervivencia Global (SG) y de Supervivencia Libre de Progresión (SLP) la superioridad de la quimioterapia a altas dosis soportada con trasplante autólogo sobre la poliquimioterapia convencional. En este ensayo clínico, aparece por primera vez el concepto de muy buena respuesta parcial (MBRP).

› Los Criterios del European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) de 1998

En 1989 el grupo de Arkansas incorporó la inmunofijación (IFx) para definir la ausencia de paraproteína en la búsqueda de una definición de RC con mayor significación clínica, a la vez que reclaman incluir en la definición de RC la exigencia de un porcentaje inferior al 1% de células plasmáticas (CP) clonales en la MO[6]. Diez años después, en la publicación de los resultados finales del primero de los programas *Total Therapy*, se indica que los pacientes que alcanzaron RC presentaron una ventaja clara en el pronóstico respecto a otros tipos de respuesta de menor calidad[7]. Los criterios de respuesta que hoy denominaríamos "convencionales", con escasas variaciones sobre los actualmente vigentes, proceden de 1998[8], fruto del primer consenso general entre representantes del EBMT y otros grupos cooperativos internacionales. En esta clasificación se formularon criterios de trabajo en MM para respuesta superando definitivamente las anteriores clasificaciones al introducir un criterio de RC basado en la ausencia de paraproteína por IFx en

suero y en orina, junto con < 5% de CP en el aspirado de MO, no incremento de las lesiones líticas presentes al diagnóstico y desaparición de los plasmocitomas de tejidos blandos. Junto con la RC, se establecieron sólidos criterios para respuesta parcial (RP), mínima respuesta (MR) y enfermedad estable (EE), además de los de recidiva (desde RC) o progresión (para pacientes sin RC previa). La validación de esta clasificación constituyó el primer trabajo conjunto del Grupo Español de Mieloma[9]. En este análisis, los pacientes en RC mostraron una ventaja estadísticamente significativa en supervivencia libre de eventos (SLE) respecto al resto de las respuestas analizadas. Sin embargo, los casos que habían obtenido una reducción de la banda M entre el 90 y el 99%, respuesta similar a la más tarde denominada MBRP, ni los pacientes con EEF negativo/IFx positiva (casi RC –CRC–) presentaban un pronóstico diferente de la RP (SLE: mediana 30; 30 y 26 meses, respectivamente; p = 0,6/SG: mediana 56; 44 y 42 meses, respectivamente; p = 0,5). Este estudio validó en todos sus términos la propuesta realizada conjuntamente por los Grupos Cooperativos EBMT/Autologus Blood & Marrow Transplant Registry (ABMTR)/International Blood and Marrow Transplant Research (IBMTR).

Desde su publicación, estos criterios (en adelante criterios EBMT) constituyen una valiosa herramienta para medir los resultados clínicos y mejorar la comparabilidad del resultado de los ensayos clínicos en MM. Aunque estos criterios no han sido prácticamente retocados hasta el momento actual[10], otras modificaciones realizadas desde el International Multiple Myeloma Working Group (IMWG)[10-13] no demasiado afortunadas han entorpecido su correcta aplicación, con el consiguiente perjuicio en la solidez y la comparabilidad de muchos ensayos clínicos.

› La inconsistencia de la Muy Buena Respuesta Parcial

La categoría MBRP fue incluida en los criterios del IMWG en la revisión de 2006[13], fundamentalmente debido a su utilización habitual en los ensayos clínicos del IFM, un grupo en el que las dificultades de acceso a la IFx en una buena parte de los componentes del grupo dió lugar al concepto de respuesta igual o superior a MBRP (≥ MBRP), aún hoy utilizado y que engloba tanto a los pacientes que alcanzan MBRP como aquellos con RC genuina. La influencia de los estudios del IFM ha mantenido la confusión entre los términos MBRP y ≥ MBRP durante años, y este efecto aún perdura, tanto que incluso podría definirse como sólidamente asentado. Especialmente representativo de este error es un estudio conjunto de los ensayos clínicos *IFM-99-02* y *99-04*[14], basado en una RC definida por EEF, en el que la profundidad de la respuesta de los pacientes clasificados como MBRP era prácticamente idéntica a los que fueron clasificados como RC por EEF. No es extraño que la conclusión fuese "MBRP es similar a RC", conclusión absolutamente previsible incluso sin necesidad de análisis estadístico alguno.

Hoy hay que defender firmemente que, aunque la categoría MBRP puede tener algún interés clínico en el seguimiento de la evolución de la respuesta, ningún análisis ha demostrado que obtener esta clase de respuesta supere a la RP. Igualmente, es necesario advertir que, aunque la categoría ≥ MBRP, a fuerza de ser utilizada, parecería gozar del respaldo de la evidencia, en realidad no existen datos que soporten esta presunción. Ya que el uso de este formato en los resultados de los estudios clínicos induce niveles importantes de confusión, con frecuencia incrementando la apariencia de resultados favorables, su utilización debería ser desaconsejada.

› La Remisión Completa Estricta. Una categoría conflictiva e irrelevante

La respuesta completa estricta (RCe) es la segunda de las incorporaciones en la actualización del IMWG de 2006[13]. Este tipo de respuesta, que pretendía mejorar la calidad de la definición de RC, fue incorporada sin una previa validación, "con el objeto de fomentar estudios que valorasen el significado clínico de una RC más exigente". Igualmente, la decisión de exigir la normalización de las ratios entre las cadenas ligeras libres en suero (*free light chain*, –FLC–) se hizo bajo el principio de que las FLC no unidas a una inmunoglobulina intacta y la ratio FLC "constituyen un excelente indicador de clonalidad"[15], pero tampoco este concepto fue previamente validado en la clínica real. La RCe exigía los mismos criterios que la RC de 1998, además de la normalización de las ratios de FLC y la ausencia de CP clonales por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia en MO después de con-

tar al menos 100 CP. Esta definición ha permanecido con pocos cambios hasta las actualizaciones más recientes de los criterios de respuesta del IMWG [10,12], respaldados por los resultados de un estudio observacional realizado en la Clínica Mayo[16] en el que los pacientes con RCe (tiempo hasta la progresión –TTP–: 50 meses) superaban llamativamente a los casos con RC (20 meses) o CRC (19 meses).

Sin embargo, la consistencia de la RCe ha sido fuertemente cuestionada[17], en primer lugar por la falta de especificidad de las ratios FLC anormales que, en estudios del Hospital Clínic[18] y otros[19,20], se asoció en más del 70% de los casos con bandas oligoclonales inespecíficas, con isotipo similar o diferente al del MM y sin relación con la profundidad de la respuesta. De hecho, en un análisis de 94 pacientes en RC incluidos en los ensayos *GEM05menos/mas65*[21], los pacientes en RCe exhiben TTP similares a los casos en RC. En este análisis tampoco hubo diferencias en el pronóstico entre los casos con ratios κ/λ normales o anormales.

El segundo aspecto cuestionable en la definición de la RCe tiene que ver con la lectura óptica de la inmunohistoquímica/inmunofluorescencia en MO, técnicas de reconocido valor en el diagnóstico del MM[22-24], pero actualmente superadas por la sensibilidad de los métodos actuales utilizados en la detección de enfermedad mínima residual (EMR). Un segundo análisis de validación integrando los pacientes de los ensayos clínicos *GEM05menos65/GEM05mas65* y *GEM2010mas65*[25] confirmó la irrelevancia para el pronóstico de la normalidad o anormalidad de las ratios κ/λ séricas. También un nuevo análisis de 459 pacientes del ensayo clínico *GEM12menos65*[26] confirma que la RCe no ofrece ningún beneficio en SLP o SG respecto a los casos que obtienen RC, ni tampoco se observaron diferencias en el pronóstico entre los pacientes en RC con ratios κ/λ normales o anormales. Los resultados son similares a los de otro subanálisis realizado en pacientes mayores incluidos en el estudio fase III *GEMmas65* en el que los casos que alcanzaron RCe no obtuvieron ninguna ventaja en SG respecto a los pacientes con RC convencional[27]. En conjunto, puede concluirse que no está justificado mantener un tipo de respuesta como la RCe, cuyo significado real respecto a la RC es escaso o inexistente y en cualquier caso depende de la combinación de los criterios tradicionales de RC con valores de EMR obtenidos por métodos de muy baja resolución, claramente inadecuados para el estado del arte actual.

› 2004-2011: los inconvenientes de la profundidad de la respuesta o la filosofía frente a la evidencia

Ya desde la demostración del efecto antitumoral del trasplante autólogo, junto al lógico entusiasmo levantado por el primer avance significativo en el tratamiento del MM desde 1968, se instala una corriente de opinión reticente a la utilización del trasplante en primera línea, justificada formalmente por la opinión de que aunque las primeras comparaciones entre trasplante y quimioterapia mejoraban los valores de las SLP, el efecto beneficioso en la supervivencia no emergió de inmediato[28,29], como por otra parte era esperable desde la lógica metodológica. Una consecuencia de esta línea de pensamiento consistió en negar el efecto beneficioso de alcanzar RC[30] y desautorizar la SLP como *end-point* adecuado[31] en una enfermedad como el MM, en la que la abrumadora mayoría de los ensayos clínicos no son diseñados con la potencia suficiente para detectar precozmente diferencias en supervivencia y en la que este parámetro depende de la eficacia de múltiples líneas de tratamiento no controladas[32,33]. Los promotores de esta visón anti-RC promovían el mero "control" de la enfermedad como objetivo primario del tratamiento[31]. Este argumentario, hoy afortunadamente superado, no contribuyó precisamente a consolidar la incorporación de criterios homogéneos de respuesta que hubiesen permitido mejorar la comparabilidad de la eficacia de los tratamientos entre ensayos clínicos.

› 2011-2017: Remisión Completa. La tardía consolidación del concepto

Los ya numerosos análisis disponibles desde la promulgación de los criterios de RC hasta muy recientemente, tanto prospectivos como retrospectivos en la era del trasplante y la quimioterapia convencional o bajo el tratamiento de las nuevas generaciones de nuevos fármacos, confirman que en el MM la RC constituye un estado relacionado con mejor pronóstico que cualquier otro tipo de respuesta inferior. Dos amplios metaanálisis, uno de ellos en 2007[34] y el segundo en 2017[35] basado en un doble análisis, confirman que, a largo plazo, la RC se correlaciona con mejor SG y SLP que cualquier otra respuesta. Completando el panorama acerca del valor de la RC, un extenso estudio italiano en un *pool* de 1.175 pacientes mayores de 65 años[36] demostró que obtener RC constituye un factor pronóstico independiente que predice

mejor SLP y SG independientemente de otros factores de riesgo, también de la edad, incluyendo ahora a los pacientes mayores de 75 años. De nuevo en este estudio, otras respuestas como RP o MBRP se asociaron con pronósticos similares, sin diferencias entre estas categorías.

Aunque los datos más recientes confirman que, en realidad, el valor pronóstico de la RC reside en la influencia de los pacientes con EMR– (véase más adelante) que se engloban como RC junto con otros casos EMR+, no es previsible que ni la RC ni otras categorías inferiores pierdan importancia en el trabajo clínico real debido a su indiscutible utilidad clínica en la valoración de la mejoría, la estabilidad o la pérdida de la respuesta, y en la indicación del momento oportuno para las determinaciones de EMR en MO.

› La respuesta en el Mieloma Múltiple interpretada según la Enfermedad Mínima Residual. El nuevo paradigma

Como es lógico, el comienzo del interés por el valor clínico de la EMR en el MM está asociado a la época del trasplante autólogo, cuando la posibilidad de obtener RC fue, por primera vez, una realidad. Otras enfermedades hematológicas curables con quimioterapia precedieron al MM en la búsqueda de respuestas de alta calidad y para cuya demostración fue necesario poner a punto análisis moleculares o inmunofenotípicos. En el MM los primeros pasos, relativamente recientes, evaluaron la EMR por PCR o citometría de baja resolución, demostrando desde los primeros estudios exploratorios la importancia de la profundidad de la EMR también en el MM y la necesidad perentoria de evaluar el significado de la enfermedad oculta, no detectada por los métodos tradicionales de evaluación, basados en los estudios de proteínas y la estimación por microscopía óptica de la afectación de la MO.

› La construcción clínica basada en la Enfermedad Mínima Residual por citometría de flujo (CMF) de baja sensibilidad (10^{-4})

Los primeros datos clínicos consolidados del Grupo Español de MM, adelantado en este campo, dando cuenta del significado pronóstico de la EMR en 295 pacientes que habían alcanzado respuestas ≥ RP tratados uniformemente dentro del programa GEM2000 fueron publicados en 2008[37]. En estos pacientes, se consideró EMR– la ausencia de CP patológicas (CPP) (< 1 CPP en 10^{-4} CP normales; sensibilidad 10^{-4}). En este contexto, los casos por EMR– al día 100 tras el trasplante autólogo obtuvieron mejores tiempos tanto para SLP (mediana 71 *vs.* 37 meses; p < 0,001) como para SG (mediana no alcanzada *vs.* 89 meses; p = 0,002); estas mismas diferencias se observaron cuando esta comparación se realizó en los 147 pacientes que obtuvieron RC con IFx negativa. De forma llamativa, en análisis multivariable solo la genética de alto riesgo mantuvo su significado adverso junto con la EMR–.

Los resultados del efecto de alcanzar EMR– en pacientes tratados con quimioterapia o talidomida, bortezomib y dexametasona (VTD) más trasplante autólogo en el ensayo fase III *GEMmenos65*, aun con la citometría de sensibilidad limitada de la época[38], reprodujeron los resultados del análisis anterior, confirmando específicamente la importancia de obtener un estatus EMR– en los casos en RC convencional Otros análisis de EMR realizados por RQ-PCR/F-PCR en pacientes incluidos en los ensayos *GIMEMA*[39] o *GEM/PETHEMA*[40] ofrecieron resultados similares a los obtenidos por citometría en los *GEM2000* y *GEM05menos65*. También en pacientes no candidatos a trasplante, la obtención de un estatus EMR–, al igual que ocurre en los pacientes jóvenes, se asocia con mejor pronóstico, como se comprobó en el estudio de 102 enfermos tratados con VMP dentro del ensayo fase III *GEMmas65*[27].

Sin excepción, todos los análisis publicados en la última década confirman las conclusiones de los primeros estudios PETHEMA/GEM. La evaluación del impacto pronóstico de la EMR– en el estudio británico *MRC IX* en 2013[41] demostró que obtener remisión inmunofenotípica (RI, límite de detección: 0,01%) se acompañaba de una connotación muy favorable tanto para SLP como SG (EMR– mediana 80,6 meses; EMR+ mediana 59 meses; p < 0,01). En este estudio, la proporción de RI fue independiente del riesgo genético y, aunque alcanzar EMR– no resolvió por completo el mal pronóstico de los casos con genética de alto riesgo, sí lo atenuó de forma significativa.

Otros subanálisis del *MRC IX* y los estudios PETHEMA/GEM mencionados han complementado la interpretación del significado de la EMR en el MM. De estos primeros estudios podrían destacarse 3 aspectos relevantes: a) la capacidad de los tratamientos de mantenimiento, que superan su propia definición al demostrarse que en el *MRC IX* el 28% de los casos EMR+ previa al inicio del mantenimiento convirtieron a

EMR– con talidomida; b) la evidencia de que el efecto pronóstico de la depleción tumoral que implica una EMR negativa es independiente del tratamiento utilizado para conseguirla[42] –aunque evidentemente la posibilidad de obtener este estatus varía según la eficacia del tratamiento–; y, finalmente, c) la demostración de que la EMR es una variable continua, ya que existe una relación directa entre el valor logarítmico de la depleción y el pronóstico, que un análisis del *MRC IX* estima en la ganancia de un año de SLP por cada logaritmo deplecionado[43].

Un nuevo análisis de largo seguimiento que incluye 609 pacientes e integra los ensayos clínicos *GEM2000/GEM2005menos65/GEM2010*[44] demuestra que el pronóstico de los pacientes RC/EMR+ es similar a RCe o RP, mientras que obtener un estatus RC/EMR– se relaciona con periodos prolongados de SLP (mediana: 63 meses) y SG (mediana no alcanzada), tanto en el análisis global de la serie como en pacientes jóvenes o mayores, e independientemente del estadio o del riesgo genético. Los modelos de Cox confirmaron que obtener EMR– asocia un elevado poder de discriminación favorable para SLP y SG, mientras que la RC pierde su relación con mejor pronóstico. Este estudio también permite observar la correlación entre índices de RC y porcentaje de casos EMR– (*GEM05menos65*[45], VBMCP/VBAD/B: RC postinducción 21%, EMR– 31%; VTD: RC postinducción 35%, EMR– 50%), causa muy probable de discrepancias en la duración de la RC según la eficacia de los tratamientos utilizados.

Un metaanálisis, publicado en 2017[46], que incluyó los resultados de 21 estudios clínicos que evaluaron la EMR tras el tratamiento de primera línea en MM, la mayoría basados en un estándar de citometría de baja resolución junto con otros en los que se utilizó ASO-qPCR con una resolución de hasta 10^{-5}, concluyó que obtener un estatus EMR– se asocia de forma indubitable con una mejoría tanto en SLP (HR: 0,41; $p < 0,001$) como en SG (HR: 0,57; $p < 0,001$), incluso, y especialmente, en los pacientes que alcanzaron RC (SLP: HR de 0,44, $p < 0,001$; SG: HR de 0,47, $p < 0,001$). Junto con otros, los resultados de este metaanálisis dieron lugar a un documento de perspectiva firmado por instituciones científicas, la industria y organismos gubernamentales norteamericanos (National Institutes of Health –NIH– y Food and Drug Administration –FDA–) dirigido a iniciar el proceso para el reconocimiento del papel de la EMR en la mejoría de la atención a los pacientes y para acortar los tiempos del desarrollo de nuevos tratamientos en el MM, de los cuales el más sobresaliente sería la aceptación de la EMR como un subrogado de pronóstico precoz capaz de sustituir a la SLP/SG como parámetro válido de eficacia terapéutica[47].

› *Las técnicas de alta resolución para Enfermedad Mínima Residual. Una nueva visión clínica*

Esta revisión no tiene como objeto discutir las ventajas o los inconvenientes de las técnicas disponibles para medir la EMR en el MM. Baste, sin embargo, decir que, a pesar de que la última clasificación del IMWG respecto a la EMR establece 2 tipos de respuestas, la inmunofenotípica o la medida por secuenciación[10], esta propuesta carece de lógica y menos si, como ocurre, llega a definir la marca comercial que ampara la técnica molecular recomendada. Considerando que el único parámetro clínicamente significativo es la profundidad de la depleción tumoral y no la técnica empleada para su medición, esta definición sin duda deberá ser rectificada. Hoy, tras la adopción del estándar EuroFlow, la sensibilidad de ambas técnicas –*next generation sequencing* (NGS)/*next generation flow* (NGF), como en el original– supera 10^{-5}, valor que con NGF en el caso del ensayo clínico *GEM12menos65* alcanzó niveles de sensibilidad al menos equivalentes a los descritos con NGS en el ensayo fase III *IFM 2009*, valorando la eficacia del esquema VRD en 1ª línea.

Los resultados del estudio del valor de la EMR por NGS[48] en el ensayo *IFM* 2009 refuerzan la perspectiva ya conocida con la CMF de menor resolución[49], aunque su mayor sensibilidad para detectar el nivel de depleción tumoral ($< 10^{-6}$) se transmite de forma proporcional a un aumento del poder de discriminar el pronóstico de los pacientes EMR–, tanto para SLP (HR: 0,24; $p < 0,001$) como SG (HR: 0,24; $p = 0,001$), respecto a los pacientes que persistieron con EMR+ finalizada la inducción, independientemente del grupo de tratamiento, el perfil de riesgo genético o el International Staging System (ISS).

Análisis similares realizados en el *GEM12menos65* tienden a incrementar y consolidar el discurso unánime que refuerza el significado clínico del estatus EMR–, aunque en nuestro estudio, quizás por la mayor intensidad de los tratamientos de inducción, la mayor duración del mantenimiento y el mejor dintel de detección de EMR ($< 2 \times 10^{-6}$ *vs.* $< 1 \times 10^{-6}$ en el *IFM 2009*), es llamativo el hecho de que con dicho tratamiento y

en los niveles de EMR descritos el pronóstico adverso relacionado con el alto riesgo genético no solo mejora, sino que desaparece. En ambos estudios[50,51] ahora, con EMR < 10^{-6}, se confirma el carácter continuo de la variable EMR, ya descrito anteriormente con niveles de EMR inferiores a 10^{-4}.

› *El valor complementario de las técnicas de imagen en la estimación de la persistencia de enfermedad tumoral*

Aunque en el MM el valor pronóstico de alcanzar un estatus EMR– está fuera de toda duda, la interpretación clínica de este parámetro para conocer su significado real en la práctica clínica y en cualquiera de los múltiples escenarios posibles debe ser aún motivo de nuevos estudios para la explicación de las discrepancias, como por ejemplo, justificar una EMR– en presencia de paraproteína o la razón por la que pacientes con EMR– aún recaen. La utilización de técnicas de imagen, fundamentalmente tomografía por emisión de positrones (PET)/tomografía computarizada (TC), contribuye a resolver al menos en parte estas discrepancias, aumentando la posibilidad de detectar enfermedad oculta, refinando así el concepto de depleción tumoral. El pronóstico adverso de la persistencia de lesiones metabólicamente activas ha sido reconocido en un reciente estudio italiano[52]. También, en un estudio retrospectivo español[53] que confirmó el valor predictivo tanto de la EMR– como de la PET/TC–, combinando ambas técnicas, los pacientes EMR– y PET/TC–, con una mediana de SLP de 92 meses y mejor SG, superan en pronóstico a otros casos EMR+, PET+ o EMR+/PET+, datos que apoyan su papel complementario, como ocurre en los pacientes del fase III *IFM 2009*[54], donde los casos que combinaron la doble negatividad para EMR y PET/TC obtuvieron mejor pronóstico que otros casos con solo PET/TC o EMR– (SLP a 3 años de 86,8 *vs.* 52,9%; p = 0,05). Hoy la necesidad de una PET/TC en la evaluación de la respuesta del MM forma parte de las recomendaciones de consenso en los criterios IMWG recién publicadas[55].

› Conclusión

En el MM, desde la época de los primeros tratamientos eficaces hasta muy recientemente cuando la curación ya se intuye en el horizonte[56,57], el valor clínico de la profundidad de la respuesta ha sido constantemente motivo de controversias y desacuerdos. Al principio, debido a la escasa eficacia de los tratamientos disponibles[2]. Más tarde, cuando por primera vez obtener la desaparición de la paraproteína estuvo al alcance de los tratamientos con quimioterapia a altas dosis soportada con trasplante autólogo[5], el objetivo de alcanzar RC fue puesto en cuestión desde una parte de la academia del MM[3,30,31] dentro de una corriente de opinión según la cual en el MM profundizar la respuesta y mejorar los tiempos de SLP, sin mejoría de la SG, no era suficiente para asegurar el efecto beneficioso de un tratamiento, una opinión que hoy sabemos equivocada. Actualmente, con la capacidad técnica de detectar en la MO niveles más profundos de EMR y disponiendo de tratamientos capaces de alcanzar estos niveles de reducción tumoral[48,50], es evidente que en el MM la profundidad de la respuesta es el objetivo primario del tratamiento[47,49,58], un objetivo solo subordinado a que, en una enfermedad en la que predominan pacientes mayores, la condición biológica del enfermo permita la aplicación de los tratamientos necesarios para obtenerla.

› Bibliografía

1. Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. Myeloma Trialists' Collaborative Group. J Clin Oncol. 1998;16(12):3832-42.
2. Corso A, Nozza A, Lazzarino M, Klersy C, Zappasodi P, Arcaini L, Bernasconi C. Plateau phase in multiple myeloma: an end-point of conventional-dose chemotherapy. Haematologica. 1999;84(4):336-41.
3. Durie BG, Jacobson J, Barlogie B, Crowley J. Magnitude of response with myeloma frontline therapy does not predict outcome: importance of time to progression in southwest oncology group chemotherapy trials. J Clin Oncol. 2004;22(10):1857-63.
4. McElwain TJ, Powles RL. High-dose intravenous melphalan for plasma-cell leukaemia and myeloma. Lancet. 1983;2(8354):822-4.
5. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, et al. A Prospective, Randomized Trial of Autologous Bone Marrow Transplantation and Chemotherapy in Multiple Myeloma. Intergroupe Français du Myélome. N Engl J Med. 1996 Jul 11;335(2):91-7.
6. Barlogie B, Alexanian R. Second International Workshop on Myeloma: advances in biology and therapy of multiple myeloma. Cancer Res. 1989;49(24 Pt 1):7172-5.
7. Barlogie B, Jagannath S, Desikan KR, Mattox S, Vesole D, Siegel D, et al. Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed multiple myeloma. Blood. 1999;93(1):55-65.

8. Bladé J, Samson D, Reece D, Apperley J, Björkstrand B, Gahrton G, et al. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant. Br J Haematol. 1998 Sep;102(5):1115-23.
9. Lahuerta JJ, Martínez-López J, de la Serna J, Bladé J, Grande C, Alegre A, et al. Remission status defined by immunofixation vs. electrophoresis after autologous transplantation has a major impact on the outcome of multiple myeloma patients. Br J Haematol. 2000 May;109(2):438-46.
10. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. Lancet Oncol. 2016;17(8):e328-e346.
11. Rajkumar SV, Buadi F. Multiple myeloma: new staging systems for diagnosis, prognosis and response evaluation. Best Pract Res Clin Haematol. 2007;20(4):665-80.
12. Rajkumar SV, Harousseau JL, Durie B, Anderson KC, Dimopoulos M, Kyle R, et al.; International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. Blood. 2011;117(18):4691-5.
13. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Bladé J, Barlogie B, Anderson K, et al.; International Myeloma Working Group. International uniform response criteria for multiple myeloma. Leukemia. 2006;20(9):1467-73.
14. Harousseau JL, Avet-Loiseau H, Attal M, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, et al. Achievement of at least very good partial response is a simple and robust prognostic factor in patients with multiple myeloma treated with high-dose therapy: long-term analysis of the IFM 99-02 and 99-04 Trials. J Clin Oncol. 2009;27(34):5720-6.
15. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Harvey TC, Drayson MT. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. Lancet. 2003;361(9356):489-91.
16. Kapoor P, Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, Buadi F, Dingli D, et al. Importance of Achieving Stringent Complete Response After Autologous Stem-Cell Transplantation in Multiple Myeloma. J Clin Oncol. 2013 Dec 20;31(36):4529-35.
17. Fernández de Larrea C, Cibeira MT, Elena M, Arostegui JI, Rovira M, Filella X, et al. Response: Free light chain assay and stringent complete remission in multiple myeloma: more questions than answers. Blood. 2010;115(16):3414-5.
18. De Larrea CF, Cibeira MT, Elena M, Arostegui JI, Rosiñol L, Rovira M, et al. Abnormal serum free light chain ratio in patients with multiple myeloma in complete remission has strong association with the presence of oligoclonal bands: implications for stringent complete remission definition. Blood. 2009;114(24):4954-6.
19. Kröger N, Asenova S, Gerritzen A, Bacher U, Zander A. Questionable role of free light chain assay ratio to determine stringent complete remission in multiple myeloma patients. Blood. 2010;115(16):3413-4.
20. Asenova S, Bacher U, Gerritzen A, Zander AR, Kröger N. Role of Free Light Chain Assay Ratio to Distinguish Between CR According EBMT Criteria or Stringent Complete Remission (sCR) According IMWG in Multiple Myeloma Patients. Blood. 2009;114(22):1787.
21. Martínez-López J, Paiva B, López-Anglada L, Mateos MV, Cedena T, Vidríales MB, et al.; Spanish Multiple Myeloma Group / Program for the Study of Malignant Blood Diseases Therapeutics (GEM / PETHEMA) Cooperative Study Group. Critical analysis of the stringent complete response in multiple myeloma: contribution of sFLC and bone marrow clonality. Blood. 2015;126(7):858-62.
22. Al-Quran SZ, Yang L, Magill JM, Braylan RC, Douglas-Nikitin VK. Assessment of bone marrow plasma cell infiltrates in multiple myeloma: the added value of CD138 immunohistochemistry. Hum Pathol. 2007;38(12):1779-87.
23. Joshi R, Horncastle D, Elderfield K, Lampert I, Rahemtulla A, Naresh KN. Bone marrow trephine combined with immunohistochemistry is superior to bone marrow aspirate in follow-up of myeloma patients. J Clin Pathol. 2008;61(2):213-6.
24. Stifter S, Babarovic E, Valkovic T, Seili-Bekafigo I, Stemberger C, Nacinovic A, et al. Combined evaluation of bone marrow aspirate and biopsy is superior in the prognosis of multiple myeloma. Diagn Pathol. 2010;5:30.
25. López-Anglada L, Cueto-Felgueroso C, Rosiñol L, Oriol A, Teruel AI, López de la Guía A, et al.; GEM (Grupo Español de MM)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) Cooperative Study Group. Prognostic utility of serum free light chain ratios and heavy-light chain ratios in multiple myeloma in three PETHEMA/GEM phase III clinical trials. PLoS One. 2018;13(9):e0203392.
26. Jiménez Ubieto A, Martínez López J, Rosiñol L, Paiva B, Cedena MT, Puig N, et al. Absence of Contribution to a Differential Outcome of the Stringent Complete Response IMWG Category Respect to the Conventional CR in Multiple Myeloma. a Validation Analysis Based on the Pethema/GEM2012MENOS65 Phase III Clinical Trial. Blood. 2018;132(Suppl 1):1943.
27. Paiva B, Martínez-López J, Vidriales MB, Mateos MV, Montalbán MA, Fernández-Redondo E, et al. Comparison of Immunofixation, Serum Free Light Chain, and Immunophenotyping for Response Evaluation and Prognostication in Multiple Myeloma. J Clin Oncol. 2011 Apr 20;29(12):1627-33.
28. Bensinger WI. Role of autologous and allogeneic stem cell transplantation in myeloma. Leukemia. 2009;23(3):442-8.
29. Koreth J, Cutler CS, Djulbegovic B, Behl R, Schlossman RL, Munshi NC, et al. High-dose therapy with single autologous transplantation versus chemotherapy for newly diagnosed multiple myeloma: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Biol Blood Marrow Transplant. 2007;13(2):183-96.
30. Bergsagel PL. A kinder, gentler way: control of the proliferative tumor compartment, not cosmetic complete response, should be the goal of myeloma therapy. Leukemia. 2008;22(4):673-5.
31. Rajkumar SV, Gahrton G, Bergsagel PL. Approach to the treatment of multiple myeloma: a clash of philosophies. Blood. 2011;118(12):3205-11.
32. Buyse M, Sargent DJ, Saad ED. Survival is not a good outcome for randomized trials with effective subsequent therapies. J Clin Oncol. 2011;29(35):4719-20; author reply 4720-1.
33. Korn EL, Freidlin B, Abrams JS. Overall survival as the outcome for randomized clinical trials with effective subsequent therapies. J Clin Oncol. 2011;29(17):2439-42.

34. Van de Velde HJ, Liu X, Chen G, Cakana A, Deraedt W, Bayssas M. Complete response correlates with long-term survival and progression-free survival in high-dose therapy in multiple myeloma. Haematologica. 2007;92(10):1399-406.
35. Van de Velde H, Londhe A, Ataman O, Johns HL, Hill S, Landers E, Berlin JA. Association between complete response and outcomes in transplant-eligible myeloma patients in the era of novel agents. Eur J Haematol. 2017;98(3):269-79.
36. Gay F, Larocca A, Wijermans P, Cavallo F, Rossi D, Schaafsma R, et al. Complete response correlates with long-term progression-free and overall survival in elderly myeloma treated with novel agents: analysis of 1175 patients. Blood. 2011;117(11):3025-31.
37. Paiva B, Vidriales MB, Cerveró J, Mateo G, Pérez JJ, Montalbán MA, et al.; GEM (Grupo Español de MM)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) Cooperative Study Groups. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. Blood. 2008;112(10):4017-23.
38. Paiva B, Gutiérrez NC, Rosiñol L, Vídriales MB, Montalbán MÁ, Martínez-López J, et al.; PETHEMA/GEM (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas/Grupo Español de Mieloma) Cooperative Study Groups. High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. Blood. 2012;119(3):687-91.
39. Ladetto M, Pagliano G, Ferrero S, Cavallo F, Drandi D, Santo L, et al. Major tumor shrinking and persistent molecular remissions after consolidation with bortezomib, thalidomide, and dexamethasone in patients with autografted myeloma. J Clin Oncol. 2010;28(12):2077-84.
40. Martínez-Sánchez P, Montejano L, Sarasquete ME, García-Sanz R, Fernández-Redondo E, Ayala R, et al. Evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma patients by fluorescent-polymerase chain reaction: the prognostic impact of achieving molecular response. Br J Haematol. 2008;142(5):766-74.
41. Rawstron AC, Child JA, de Tute RM, Davies FE, Gregory WM, Bell SE, et al. Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. J Clin Oncol. 2013;31(20):2540-7.
42. Paiva B, Vidriales MB, Montalbán MA, Mateos MV, Rosiñol L, Martínez J, et al. Analysis of Immunophenotypic Response (IR) by Multiparameter Flow Cytometry In 516 Myeloma Patients Included In Three Consecutive Spanish Trials. Blood. 2010;116(21):1910.
43. Rawstron AC, Gregory WM, de Tute RM, Davies FE, Bell SE, Drayson MT, et al. Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: independent prediction of survival benefit per log reduction. Blood. 2015;125(12):1932-5.
44. Lahuerta JJ, Paiva B, Vidriales MB, Cordón L, Cedena MT, Puig N, et al.; GEM (Grupo Español de Mieloma)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) Cooperative Study Group. Depth of Response in Multiple Myeloma: A Pooled Analysis of Three PETHEMA/GEM Clinical Trials. J Clin Oncol. 2017 Sep 1;35(25):2900-10.
45. Rosiñol L, Oriol A, Teruel AI, Hernández D, López-Jiménez J, de la Rubia J, et al.; Programa para el Estudio y la Terapéutica de las Hemopatías Malignas/Grupo Español de Mieloma (PETHEMA/GEM) group. Superiority of bortezomib, thalidomide, and dexamethasone (VTD) as induction pretransplantation therapy in multiple myeloma: a randomized phase 3 PETHEMA/GEM study. Blood. 2012;120(8):1589-96.
46. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Rawstron AC, Owen RG, Child JA, Thakurta A, et al. Association of Minimal Residual Disease With Superior Survival Outcomes in Patients With Multiple Myeloma: A Meta-analysis. JAMA Oncol. 2017;3(1):28-35.
47. Anderson KC, Auclair D, Kelloff GJ, Sigman CC, Avet-Loiseau H, Farrell AT, et al. The Role of Minimal Residual Disease Testing in Myeloma Treatment Selection and Drug Development: Current Value and Future Applications. Clin Cancer Res. 2017;23(15):3980-93.
48. Perrot A, Lauwers-Cances V, Corre J, Robillard N, Hulin C, Chretien ML, et al. Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma. Blood. 2018;132(23):2456-64.
49. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C, Leleu X, Caillot D, Escoffre M, et al. Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. N Engl J Med. 2017 Apr 6;376(14):1311-20.
50. Paiva B, Puig N, Cedena MT, Cordón L, Vidriales MB, Burgos L, et al. Impact of Next-Generation Flow (NGF) Minimal Residual Disease (MRD) Monitoring in Multiple Myeloma (MM): Results from the Pethema/GEM2012 Trial. Blood. 2017;130(Suppl 1):905.
51. Avet-Loiseau H, Lauwers-Cances V, Corre J, Moreau P, Attal M, Munshi N. Minimal Residual Disease in Multiple Myeloma: Final Analysis of the IFM2009 Trial. Blood. 2017;130(Suppl 1):435.
52. Zamagni E, Nanni C, Mancuso K, Tacchetti P, Pezzi A, Pantani L, et al. PET/CT Improves the Definition of Complete Response and Allows to Detect Otherwise Unidentifiable Skeletal Progression in Multiple Myeloma. Clin Cancer Res. 2015;21(19):4384-90.
53. Alonso R, Cedena MT, Gómez-Grande A, Ríos R, Moraleda JM, Cabañas V, et al. Imaging and bone marrow assessments improve minimal residual disease prediction in multiple myeloma. Am J Hematol. 2019 Aug;94(8):853-61.
54. Moreau P, Attal M, Caillot D, Macro M, Karlin L, Garderet L, et al. Prospective Evaluation of Magnetic Resonance Imaging and [18F]Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography-Computed Tomography at Diagnosis and Before Maintenance Therapy in Symptomatic Patients With Multiple Myeloma Included in the IFM/DFCI 2009 Trial: Results of the IMAJEM Study. J Clin Oncol. 2017 Sep 1;35(25):2911-8.
55. Hillengass J, Usmani S, Rajkumar SV, Durie BGM, Mateos MV, Lonial S, et al. International myeloma working group consensus recommendations on imaging in monoclonal plasma cell disorders. Lancet Oncol. 2019;20(6):e302-e312.
56. Gertz MA. Multiple myeloma - a cure within reach. Leuk Lymphoma. 2018;59(11):2521-3.
57. Morgan GJ, Rasche L. Maintaining therapeutic progress in multiple myeloma by integrating genetic and biological advances into the clinic. Expert Rev Hematol. 2018;11(7):513-23.
58. Harousseau JL, Avet-Loiseau H. Minimal Residual Disease Negativity Is a New End Point of Myeloma Therapy. J Clin Oncol. 2017;35(25):2863-5.

Inmunoterapia en el mieloma

Paula Rodríguez-Otero[1], Bruno Paiva[2], Ana Alfonso[1], Felipe Prósper[1], José Juan Rifón[1], Jesús F. San Miguel[3]

[1] Departamento de Hematología, Clínica Universidad de Navarra, Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), Pamplona;
[2] Laboratorio de Citometría. Centro de Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, IdiSNA, Pamplona;
[3] Medicina Traslacional, Clínica Universidad de Navarra, Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), IdiSNA, Pamplona

› Resumen

La supervivencia de los pacientes con mieloma ha mejorado de forma significativa en la última década gracias a la incorporación de nuevos fármacos; sin embargo, la enfermedad tiende a recaer y la supervivencia de los pacientes que fracasan a la primera generación de inhibidores del proteasoma e inmunomoduladores es corta a pesar de la disponibilidad de nuevos fármacos y combinaciones. Estos datos subrayan la necesidad de desarrollar nuevas estrategias que sean capaces de rescatar el mal pronóstico de estos pacientes. El empleo de tratamientos dirigidos a aprovechar el sistema inmune del paciente para luchar contra la enfermedad puede ser la manera de superar la refractariedad a los fármacos convencionales. En este trabajo se repasarán los resultados clínicos obtenidos con las distintas estrategias de inmunoterapia, resultados que están modificando la historia de la enfermedad y han situado al mieloma bajo el foco de la inmunooncología.

› Introducción

La supervivencia de los pacientes con mieloma múltiple (MM) se ha prolongado de forma significativa en los últimos años gracias a la incorporación de nuevos fármacos y combinaciones de gran eficacia. Sin embargo, en una proporción mayoritaria de pacientes la enfermedad recaerá y, a pesar de la disponibilidad de nuevos tratamientos, la supervivencia de los pacientes que presentan refractariedad a los fármacos convencionales (bortezomib y lenalidomida) es muy corta (mediana de supervivencia global –SG–: 15,2 meses)[(1)]. Por lo tanto, continúa siendo imprescindible el desarrollo de nuevas terapias. En esta línea, la activación del sistema inmune, a través de diferentes estrategias de inmunoterapia, puede ser la manera más adecuada de superar la refractariedad a los tratamientos convencionales.

Existen múltiples evidencias que subrayan la importancia del sistema inmune en la progresión de las neoplasias, como resultado de la desregulación y el fallo en la vigilancia inmunológica. En concreto, en el MM se ha descrito que aquellos pacientes que presentan un sistema inmune más preservado tienen mayor supervivencia. En este sentido, hemos identificado la existencia de una pequeña proporción de pacientes que presentan enfermedad mínima residual (EMR) positiva asociada a una recuperación de la linfopoyesis B normal y que tienen una supervivencia libre de progresión (SLP) equivalente a la de los pacientes con EMR negativa, lo que subraya la importancia de mantener un sistema inmune activo en el control de la enfermedad a largo plazo[(2)]. Otra evidencia de la importancia del sistema inmune es la observación de una potente reconstitución inmunológica en los pacientes con mieloma largos supervivientes (libres de progresión durante > 10 años)[(3)].

› Objetivos de la inmunoterapia en el mieloma múltiple

Existen distintas estrategias para impulsar el sistema inmune en el control de las células mielomatosas: estrategias de inmunoterapia pasiva como los anticuerpos monoclonales o terapia celular adoptiva con células modificadas genéticamente y estrategias de inmunoterapia activa como las vacunas antitumorales, fármacos inmunomoduladores o tratamientos activadores de células T, como los anticuerpos biespecíficos.

Tabla 1. Resumen de la eficacia de las tratamientos que emplean anticuerpos monoclonales (daratumumab y elotuzumab)

	MAIA (fase III)	*ALCYONE* (fase III)	*POLLUX* (fase III)	*CASTOR* (fase III)	*ELOQUENT-2* (fase III)	*ELOQUENT-3* (fase II)
Diseño	DRd *vs.* Rd	DVMP *vs.* VMP	DRd *vs.* Rd	DVD *vs.* VD	EloRD *vs.* Rd	EloPd *vs.* Pd
Pacientes	No candidato a TASPE 1.ª línea	No candidato a TASPE 1.ª línea	Recaída > 1 línea previa	Recaída > 1 línea previa	Recaída 1-3 líneas previas	> 2 líneas previas RRMM
RG	91 *vs.* 74%	93 *vs* 81%	93 *vs.* 76%	85 *vs.* 63%	79 *vs.* 66%	53 *vs.* 26%
RC	43 *vs.* 24%	48 *vs.* 25%	57 *vs.* 23%	30 *vs.* 10%	–	–
Mediana SLP (m)	NA *vs.* 31,9 HR: 0,56 p < 0,0001	NA *vs.* 19,1 HR: 0,43 p < 0,001	44,5 *vs.* 17,5 HR: 0,44 p < 0,0001	16,7 *vs.* 7,1 HR: 0,31 p < 0,0001	19,4 *vs.* 14,9 HR: 0,73 p < 0,001	10,3 *vs.* 4,7 HR: 0,54 p = 0,008
Mediana SG (m)	–	–	–	–	48,3 *vs.* 39,6 HR: 0,78 (0,53-0,96)	–

DRd: daratumumab, lenalidomida, dexametasona; DVD: daratumumab, bortezomib, dexametasona; DVMP: daratumumab, bortezomib, melfalán, prednisona; EloPd: elotuzumab, pomalidomida, dexametasona; EloRd: elotuzumab, lenalidomida, dexametasona; HR: *hazard ratio*; NA: no alcanzada; Pd: pomalidomida, dexametasona; RC: respuestas completas; Rd: lenalidomida, dexametasona; RG: respuestas globales; SG (m): supervivencia global (meses); SLP (m): supervivencia libre de progresión (meses); VD: bortezomib, dexametasona; VMP: bortezomib, melfalán, prednisona

› *Anticuerpos monoclonales*

El empleo de anticuerpos monoclonales ha supuesto una revolución en el tratamiento del MM. Hasta la fecha existen 2 anticuerpos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) y la European Medicines Agency (EMA) para el tratamiento de pacientes con MM: elotuzumab y daratumumab.

Elotuzumab es un anticuerpo monoclonal IgG1-kappa con especificidad frente al antígeno SLAMF7 (*signalling lymphocytic activation molecule family 7* –previamente conocida como CS1–). SLAMF7 está sobreexpresado en células de MM, células NK, células plasmáticas normales y otras células del sistema inmune. Como agente único, elotuzumab no es capaz de inducir respuestas objetivas, aunque sí ha demostrado eficacia en combinación con fármacos inmunomoduladores (lenalidomida y pomalidomida). Así, en el ensayo clínico fase III *Eloquent-2*, que incluyó pacientes con MM en recaída precoz (1-3 líneas previas), la combinación de elotuzumab, lenalidomida y dexametasona (Rd) se comparó al estándar Rd. Los resultados del estudio demostraron que la rama de elotuzumab-Rd fue superior al tratamiento control en SLP con una mediana de 19,4 meses para la rama de elotuzumab frente a 14,9 meses para Rd[4] (Tabla 1). De igual manera, en el ensayo *Eloquent III*, elotuzumab-pomalidomida-dexametasona fue superior a pomalidomida-dexametasona en SLP (10,3 *vs.* 4,7 meses; HR: 0,54; p = 0,008) en una población de pacientes con MM en recaída y refractario[5] (Tabla 1).

Pero, sin duda, el anticuerpo que está revolucionando el curso de esta enfermedad es daratumumab, un anticuerpo IgG-kappa anti-CD38. CD38 está expresada de forma universal en células plasmáticas, tanto normales como mielomatosas, así como en otras células del sistema inmune (células NK, dendríticas y subpoblaciones de linfocitos B, T y células mieloides). Su expresión en la célula plasmática patológica es mayor que en la plasmática normal, lo que lo convierte en una diana atractiva para el tratamiento de pacientes con MM. A diferencia de elotuzumab, daratumumab sí es capaz de inducir respuestas objetivas como agente único (30% de tasa de respuestas globales) en una población de pacientes con MM en recaída y refractario[6]. Además, su utilización en combinación con distintos tratamientos estándar, como Rd[7,8], bortezomib-dexametasona (Vd)[9] y bortezomib-melfalán-prednisona (MPV)[10], ha demostrado incrementar de forma significativa tanto las tasas de respuesta como la profundidad de las mismas y la SLP en distintos ensayos clínicos fase 3 (Tabla 1). Otros anticuerpos frente a CD38, como isatuximab o MOR202 están en desarrollo clínico con resultados igualmente prometedores.

Otras opciones terapéuticas en desarrollo en el campo de los anticuerpos monoclonales son los anticuerpos biespecíficos y los anticuerpos conjugados. Estos últimos se caracterizan por transportar una "car-

ga" a la célula tumoral. Esta carga puede ser un citostático (como la monometil auristatina F –MMAF–) o un agente radiactivo, entre otros. El fármaco que tiene un desarrollo clínico más avanzado es un anticuerpo frente a BCMA conjugado con la molécula de MMAF. Este fármaco (GSK2857916) se ha evaluado en un ensayo clínico fase I en el que se incluyeron 35 pacientes con MM refractario alcanzando un tasa de respuesta global del 60% con una mediana de SLP de 12 meses (datos actualizados)[11].

› *Terapia celular adoptiva: células CAR-T*

La terapia celular adoptiva se define de forma genérica como aquel tratamiento que emplea poblaciones celulares manipuladas o expandidas *ex vivo*. Ejemplos de este tipo de terapias serían la infusión de linfocitos infiltrantes de tumor (*tumor infiltrating lymphocytes* –TIL–), células T modificadas (células CAR o TCR), células NK o dendríticas.

De forma general, los linfocitos que infiltran el sitio tumoral (TIL) pueden ser capaces de reconocer los antígenos tumorales; sin embargo, se encuentran generalmente anérgicos, debido a la expresión de moléculas inhibidoras como PD-1 o CTLA-4. Al retirarlos del ambiente inhibitorio del tumor y expandirlos *ex vivo*, se pueden activar, de forma que al reinfundirlos al paciente sean capaces, en algunos casos, de mediar la destrucción del tumor. La carga mutacional derivada de la expresión de neoantígenos por parte del tumor es un factor limitante de la actividad de los TIL y explica que su uso se haya restringido fundamentalmente al tratamiento de algunos tumores sólidos (por ejemplo, melanoma), siendo su experiencia en neoplasias hematológicas muy escasa[12].

Los avances en el campo de la terapia génica han simplificado la generación de células T con especificidad antitumoral, superando muchas de las barreras prácticas que han limitado la utilización de los TIL. Virtualmente, mediante la modificación genética, se podría disponer de células con especificidad frente a cada histología tumoral, ampliando de forma radical el número de pacientes que se podrían beneficiar de esta terapia. La generación de células T específicas frente a un tumor mediante la utilización de técnicas de ingeniería genética se puede llevar a cabo de 2 formas. En una primera aproximación, un TCR con especificidad antitumoral es clonado y transferido a linfocitos T, de manera que estos linfocitos van a expresar el receptor con especificidad antitumoral. La segunda estrategia sería mediante el uso de CAR (receptores antigénicos quiméricos, *chimeric antigen receptor*). Los CAR son proteínas de fusión que contienen un dominio extracelular de unión al antígeno que está formado por la secuencia de un anticuerpo (scFV), que se une a una región intracelular que contiene motivos de señalización capaces de activar al linfocito T como CD3z y otras moléculas de coestímulo como CD28 o CD137. Estos constructos son a su vez transferidos a los linfocitos autólogos del paciente que expresarán el receptor quimérico[13].

Los resultados clínicos empleando células CAR son todavía escasos aunque prometedores, siendo BCMA la diana más empleada. En la Tabla 2 se resumen las características de los distintos CAR frente a BCMA que se están evaluando en el contexto de ensayos clínicos fase I-II, así como los principales datos de eficacia y toxicidad. Cabe destacar que las tasas de respuesta empleando este tratamiento son muy altas (≈ 80-95%), con respuestas profundas incluyendo respuestas completas con EMR negativa en un porcentaje alto de los pacientes (≈ 50-65%) y con una mediana de SLP de entre 12 y 15 meses, si bien la proporción de pacientes curados con esta estrategia parece inferior a la de los pacientes con leucemia linfoblástica o linfomas tratados con CAR-T[14-17].

› *Estrategias de inmunoterapia activa: vacunas, inhibidores de* checkpoint*, activadores de células T (*T-cell engagers*)*

Otra estrategia para reforzar la inmunidad antitumoral es empleando los anticuerpos biespecíficos, también denominados en inglés *T-cell engagers*. Estos anticuerpos se caracterizan por presentar una doble especificidad antigénica, frente a la célula tumoral y la célula del sistema inmune (linfocito T, célula NK…). De esta manera, se encargan de aproximar la célula efectora del sistema inmune a la célula tumoral y así evitar los mecanismos de evasión o inhibición del sistema inmune que desarrolla el tumor. Actualmente, se están evaluando diferentes anticuerpos biespecíficos frente a BCMA en distintos ensayos fase I. Los resultados preliminares de un ensayo fase I empleando un anticuerpo de tipo BiTE® frente a BCMA (AMG-420) demostraron una tasa de respuestas globales del 70% a la dosis máxima tolerada (400 µg/kg) con un perfil de seguridad aceptable[18].

Tabla 2. Resumen de los ensayos clínicos con linfocitos CAR-T frente a BCMA

	Anti-BCMA CAR[1] NCT02215967	bb2121[2] NCT02658929	CAR T-BCMA[3] NCT02546167	LCAR-B38M[4] NCT03090659
Grupo/Compañía	NCI	Bluebird/Celgene	UPenn/Novartis	Nanjing Legend Biotech
ScFV	11D5-3	NR, murino	NR, humano	NR, humano
Dominio de coestímulo	CD28	41BB	41BB	41BB
Transferencia génica	Y-retroviral	Lentiviral	Lentiviral	Lentiviral
Linfodepleción	CFM 300 mg/m^2 × 3 + Flu 30 mg/m^2 × 3	CFM 300 mg/m^2 × 3 + Flu 30 mg/m^2 × 3	Nada o CFM 1,5 g/m^2	CFm 300 mg/m^2 × 3
Rango de dosis	0,3-9,0 × 10^6	50, 150, 450 y 800 × 10^6	10-50 × 10^6 o 100-500 × 10^6	1,5-7,0 × 10^6
Pacientes tratados	**16** pacientes a la dosis de 9 × 10^6/kg	**22** (> 150 × 10^6 células)	**21 (3 cohortes)**: • n = 9 (10-500 × 10^6 - No CFM) • n = 5 (10-50 × 10^6 - CFM) • n = 7 (100-500 × 10^6 CFM)	**57**
Expresión de BCMA requerida	Sí	Solo en la escalada de dosis	No	Sí (> 10% PC)
Mediana de n.º de líneas previas	9,5	7 (escalada) 8 (expansión)	7 (3-11)	3
Eficacia	ORR 14/16 (81%) 11/14 (79%) MRD– Mediana SLP: 7,2 m	86,4% ≥ VGPR (50% CRs/CR) Mediana SLP: 11,8 m En MRD(–): mSLP 17,7 m	#1: 67% (1 CRs, 1 VGPR) #2: (40%) 1 PR, 1 MR #3: (83%) 1 CR, 3 PR, 1 MR	ORR: 88% 42 CRs (74%) 2 VGPR (4%) 6 PR (11%)
Seguridad	CRS todos los grados: 100% Grado 3-4: 37%	CRS: 63% Grado ≥ 3 en 2 pacientes resuelto en 24 h	CRS: 17 pacientes (grado 3: 32%) Neurotoxicidad: 3 (2 grado 4)	CRS grado 3 transitorio (7%) Neurotoxicidad: 1 grado 1

CFM: ciclofosfamida; CR: respuesta completa; CRs: respuesta completa estricta; CRS: síndrome de liberación de citocinas; Flu: fludarabina; MR: respuesta menor; MRD: enfermedad mínima residual; NR: no reportado; ORR: tasa de respuestas globales; PR: respuesta parcial; SLP: supervivencia libre de progresión; VGPR: muy buena respuesta parcial

Por otro lado, también podemos emplear vacunas para incrementar la respuesta inmune antimieloma. Básicamente, existen 2 estrategias: las vacunas basadas en péptidos (NY-ESO-1, MAGE-AE, WT-1, XBP-1) o las que emplean células dendríticas fusionadas con lisado tumoral, que permiten la presentación de un amplio rango de antígenos tumorales. Hasta la fecha, su éxito en el tratamiento del cáncer ha sido escaso debido fundamentalmente a un escaso número de células T específicas, migración pobre al sitio del tumor o a la presencia de un ambiente peritumoral inmunosupresor. En el caso del mieloma, merecen una mención especial los estudios del Dana-Farber, con varios ensayos empleando vacunas de células dendríticas[19].

Finalmente, se puede activar la inmunidad antitumoral actuando sobre el ambiente inmunosupresor generado por el tumor a través de los receptores de *checkpoint* y de forma especial sobre el eje PD-1/PD-L1. PD-1 (*programmed death receptor-1*) es uno de los receptores inhibidores más importantes en la respuesta inmune antitumoral. Se expresa en la superficie de los linfocitos T activados y se une a sus ligandos (PD-L1 y PD-L2), que se expresan a su vez en la superficie de las células tumorales y de las células presenta-

doras de antígeno. La unión de PD-1 con sus ligandos conduce a una inhibición de la respuesta T. Esta vía es empleada por las células tumorales para generar un microambiente tumoral permisivo. El tratamiento con inhibidores de PD-1 (pembrolizumab, nivolumab) ha revolucionado el campo de la oncología y su uso se ha extendido al campo de la hematología con gran eficacia, por ejemplo, en enfermedad de Hodgkin. En el MM, a pesar de los resultados prometedores en combinación con inmunomoduladores (lenalidomida y pomalidomida) en 2 ensayos fase II, su desarrollo clínico se ha abandonado tras observase en los ensayos clínicos aleatorizados fase III con pembrolizumab en combinación con lenalidomida y pomalidomida un incremento en el número de muertes en la rama con pembrolizumab y un impacto negativo en la supervivencia global[20].

› Conclusión

En conclusión, a pesar de una mejora continuada en la supervivencia de los pacientes con MM gracias a la incorporación de nuevos tratamientos, los pacientes recaen y la supervivencia tras el fracaso a la primera generación de inhibidores del proteasoma e inmunomoduladores sigue siendo pobre, subrayando la necesidad de disponer de nuevos tratamientos. Las nuevas estrategias de inmunoterapia que están en desarrollo clínico están modificando el curso de la enfermedad logrando resultados sin precedentes que sin duda derivarán en una mejora en la supervivencia de los pacientes.

› Bibliografía

1. Kumar SK, Dimopoulos MA, Kastritis E, Terpos E, Nahi H, Goldschmidt H, et al. Natural history of relapsed myeloma, refractory to immunomodulatory drugs and proteasome inhibitors: a multicenter IMWG study. Leukemia. 2017;31(11):2443-8.
2. Paiva B, Cedena MT, Puig N, Arana P, Vidriales MB, Cordon L, et al.; Grupo Español de Mieloma/Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas (GEM/PETHEMA) Cooperative Study Groups. Minimal residual disease monitoring and immune profiling in multiple myeloma in elderly patients. Blood. 2016;127(25):3165-74.
3. Pessoa de Magalhães RJ, Vidriales MB, Paiva B, Fernández-Giménez C, García-Sanz R, Mateos MV, et al.; Spanish Myeloma Group (GEM); Grupo Castellano-Leonés de Gammapatías Monoclonales, cooperative study groups. Analysis of the immune system of multiple myeloma patients achieving long-term disease control by multidimensional flow cytometry. Haematologica. 2013;98(1):79-86.
4. Lonial S, Dimopoulos M, Palumbo A, White D, Grosicki S, Spicka I, et al. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. N Engl J Med. 2015 Aug 13;373(7):621-31.
5. Dimopoulos MA, Dytfeld D, Grosicki S, Moreau P, Takezako N, Hori M, et al. Elotuzumab plus Pomalidomide and Dexamethasone for Multiple Myeloma. N Engl J Med. 2018 Nov 8;379(19):1811-22.
6. Usmani SZ, Weiss BM, Plesner T, Bahlis NJ, Belch A, Lonial S, et al. Clinical efficacy of daratumumab monotherapy in patients with heavily pretreated relapsed or refractory multiple myeloma. Blood. 2016;128(1):37-44.
7. Bahlis N, Dimopoulos MA, White DJ, Benboubker L, Cook G, Leiba M, et al. Three-Year Follow up of the Phase 3 Pollux Study of Daratumumab Plus Lenalidomide and Dexamethasone (D-Rd) Versus Lenalidomide and Dexamethasone (Rd) Alone in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma (RRMM). Blood. 2018;132(Suppl 1):1996.
8. Facon T, Kumar SK, Plesner T, Orlowski RZ, Moreau P, Bahlis N, et al. Phase 3 Randomized Study of Daratumumab Plus Lenalidomide and Dexamethasone (D-Rd) Versus Lenalidomide and Dexamethasone (Rd) in Patients with Newly Diagnosed Multiple Myeloma (NDMM) Ineligible for Transplant (MAIA). Blood. 2018;132(Suppl 1):LBA-2.
9. Usmani SZ, Mateos M-V, Lentzsch S, Quach H, Capra M, Ovilla R, et al. Efficacy of Daratumumab in Combination with Standard of Care Regimens in Lenalidomide-Exposed or -Refractory Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (RRMM): Analysis of the Castor, Pollux, and MMY1001 Studies. Blood. 2018;132(Suppl 1):3288.
10. Dimopoulos MA, Mateos MV, Cavo M, Suzuki K, Jakubowiak A, Knop S, et al. One-Year Update of a Phase 3 Randomized Study of Daratumumab Plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone (D-VMP) Versus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone (VMP) in Patients (Pts) with Transplant-Ineligible Newly Diagnosed Multiple Myeloma (NDMM): Alcyone. Blood. 2018;132(Suppl 1):156.
11. S, Lendvai N, Popat R, Voorhees PM, Reeves B, et al. Deep and Durable Responses in Patients (Pts) with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (MM) Treated with Monotherapy GSK2857916, an Antibody Drug Conjugate Against B-Cell Maturation Antigen (BCMA): Preliminary Results from Part 2 of Study BMA117159. Blood. 2017;130(Suppl 1):741.
12. Noonan KA, Huff CA, Davis J, Lemas MV, Fiorino S, Bitzan J, et al. Adoptive transfer of activated marrow-infiltrating lymphocytes induces measurable antitumor immunity in the bone marrow in multiple myeloma. Sci Transl Med. 2015 May 20;7(288):288ra78.
13. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. Nat Rev Immunol. 2012 Mar 22;12(4):269-81.
14. Raje N, Berdeja J, Lin Y, Siegel D, Jagannath S, Madduri D, et al. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. N Engl J Med. 2019 May 2;380(18):1726-37.
15. Cohen AD, Garfall AL, Stadtmauer EA, Melenhorst JJ, Lacey SF, Lancaster E, et al. B cell maturation antigen-specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma. J Clin Invest. 2019 Mar 21;129(6):2210-21.

16. Brudno JN, Maric I, Hartman SD, Rose JJ, Wang M, Lam N, et al. T Cells Genetically Modified to Express an Anti-B-Cell Maturation Antigen Chimeric Antigen Receptor Cause Remissions of Poor-Prognosis Relapsed Multiple Myeloma. J Clin Oncol. 2018 Aug 1;36(22):2267-80.
17. Zhao WH, Liu J, Wang BY, Chen YX, Cao XM, Yang Y, et al. Updated Analysis of a Phase 1, Open-Label Study of LCAR-B38M, a Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy Directed Against B-Cell Maturation Antigen, in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. Blood. 2018;132(Suppl 1):955.
18. Topp MS, Duell J, Zugmaier G, Attal M, Moreau P, Langer C, et al. Treatment with AMG 420, an Anti-B-Cell Maturation Antigen (BCMA) Bispecific T-Cell Engager (BiTE®) Antibody Construct, Induces Minimal Residual Disease (MRD) Negative Complete Responses in Relapsed and/or Refractory (R/R) Multiple Myeloma (MM) Patients: Results of a First-in-Human (FIH) Phase I Dose Escalation Study. Blood. 2018;132(Suppl 1):1010.
19. Rosenblatt J, Avivi I, Vasir B, Uhl L, Munshi NC, Katz T, et al. Vaccination with dendritic cell/tumor fusions following autologous stem cell transplant induces immunologic and clinical responses in multiple myeloma patients. Clin Cancer Res. 2013 Jul 1;19(13):3640-8.
20. Mateos MV, Orlowski RZ, Ocio EM, Rodríguez-Otero P, Reece D, Moreau P, et al. Pembrolizumab combined with lenalidomide and low-dose dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma: phase I KEYNOTE-023 study. Br J Haematol. 2019 Sep;186(5):e117-e121.

Macroglobulinemia de Waldenström

Ramón García Sanz, Cristina Jiménez, Verónica González de la Calle, M. Isabel Prieto-Conde, María García-Álvarez, Alejandro Medina, M. Eugenia Sarasquete, Miguel Alcoceba, Noemí Puig, Norma C. Gutiérrez, M. Carmen Chillón, Marcos González-Díaz
Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca

› Concepto y definición

Para diagnosticar una macroglobulinemia de Waldenström (MW) es necesario encontrar una gammapatía monoclonal IgM y demostrar la presencia de linfocitos B monoclonales infiltrando la médula ósea (MO), y posiblemente órganos linfoides[1,2]. La primera vez que fue descrita fue en 1944, cuando Jan Waldenström observó un síndrome caracterizado por "anemia, diátesis hemorrágica, linfadenopatías, infiltración linfoplasmocitaria en medula ósea y elevación de globulinas séricas (macroglobulinas)"[3]. Para diagnosticarlo hay que descartar otras neoplasias linfoides de células B pequeñas en las que puede haber diferenciación plasmocitaria, en especial leucemia linfoide crónica/linfoma linfocítico de células pequeñas (LLC) y linfomas de la zona marginal (LZM). También hay que descartar el linfoma linfoplasmocítico (LLP) puro, que se asocia a paraproteína monoclonal en dos tercios de los casos. En estos casos, el LLP carecería de infiltración linfocitaria de la MO y/o el componente monoclonal no sería IgM.

› Epidemiología y etiopatogenia

La MW es poco frecuente. En España ronda los 3,1 casos por millón de habitantes y año[4]. No obstante, su aumento paulatino con la edad hace que llegue a casi 30 a los 80 años. Representa el 3% de todas las gammapatías monoclonales (17% de las gammapatías IgM), el 2% de los linfomas y el 6% de los síndromes linfoproliferativos B (SLP-B) leucémicos. Afecta sobre todo a pacientes de edad avanzada (mediana de 71 años) y es más frecuente en varones (70%) de raza blanca.

La MW se debe a un proceso de transformación neoplásica que acumula fenómenos oncogénicos secuenciales. Hay cambios genéticos entre diagnóstico y progresión (evolución clonal), de modo que van apareciendo subclones cada vez más proliferativos, menos secretores y más resistentes al tratamiento[5]. El primer evento oncogénico sería la aparición de la mutación MYD88 L265P en una célula con reordenamiento e hipermutación somática de los genes IgH, pero incapaz de llevar a cabo el cambio de clase. Sobre ella luego se van acumulando mutaciones en genes como CXCR4 (40%), CD79B (8%), HIST1H1E (7%), MYBBP1A (5%), ARID1A (3%) y HIST1H1B (3%)[6,7].

› Clínica y proceso diagnóstico

Para el diagnóstico de MW es **obligatorio** demostrar un LLP en la **biopsia ósea**. En el **aspirado medular** de la MW se ve una población polimorfa, con cantidad variable de linfocitos y linfoplasmocitos, así como algunas células plasmáticas (CP), y son frecuentes los mastocitos. Si hay alguna adenopatía accesible, es recomendable biopsiarla para descartar otros tipos de linfoma, en especial si hay adenopatías hipercaptantes en la tomografía por emisión de positrones (PET)-tomografía computarizada (TC).

La MW tiene un curso crónico y puede permanecer estable durante años sin síntomas importantes. El primer síntoma suele ser astenia progresiva, seguido de hemorragias, manifestaciones neurológicas y adenopatías[4]. Hasta un 20% de los casos tiene manifestaciones iniciales inusuales: respiratorias, oculares, insuficiencia renal, síntomas cutáneos, etc. El diagnóstico también puede ser casual, al ver un proteinograma con componente M o una velocidad de sedimentación globular (VSG) elevada en un estudio realizado por otra causa.

Es necesario hacer una evaluación detallada por sistemas para tener un buen control de los pacientes.

Los síntomas y signos clínicos de la MW se deben al crecimiento y la infiltración tumoral o a la presencia de la paraproteína IgM. La enfermedad es poco agresiva, por lo que los síntomas suelen ser leves. El 25-50% de los pacientes presenta un cuadro constitucional (astenia, anorexia, pérdida de peso) más o menos evidente[4]. Puede haber citopenias periféricas, en especial anemia, agravada por hemodilución secundaria a hipervolemia o hiperviscosidad. Solo un 15-30% de los casos tiene hepatomegalia, esplenomegalia o adenopatías palpables. La infiltración extraganglionar es poco frecuente y generalmente con poca repercusión clínica[4].

Las concentraciones elevadas de IgM aumentan la viscosidad sanguínea y pueden provocar un **síndrome de hiperviscosidad** (10-20% de los casos)[2]. No hay relación directa entre cantidad de IgM y síntomas, pero si la concentración es < 30 g/L casi nunca hay. Las manifestaciones clínicas son: a) **neurológicas y oculares**: cefalea, confusión, vértigo, somnolencia y estupor progresivos, y, al final, convulsiones y coma. En el fondo de ojo pueden verse imágenes vasculares en "ristra de salchichas", así como exudados, hemorragias, desprendimientos serosos, microaneurismas, papiledema e incluso oclusión de la vena central de la retina. Si el sistema nervioso central (SNC) está infiltrado, hablamos de ***síndrome de Bing-Neel***[8]; b) **cardiacas**, como insuficiencia cardiaca; y c) **hemorrágicas**, en especial epistaxis.

La IgM se comporta como **crioglobulina** en el 10-20% de los pacientes, pero solo da clínica en la cuarta parte de ellos en forma de fenómeno de Raynaud, necrosis acra (oreja, nariz, dedos) y púrpura vascular. Más raras son urticaria, acrocianosis, úlceras supramaleolares, *livedo reticularis*, artralgias o insuficiencia renal.

Por último, la IgM puede tener actividad anticuerpo y provocar diátesis hemorrágica por alteraciones plaquetarias, defectos de coagulación (IgM antifactores), anticoagulante lúpico dando riesgo trombótico, crioaglutinina fría (fenómeno de Raynaud, anemia hemolítica) o déficit del complemento. También puede producir polineuropatía periférica desmielinizante crónica, en especial si tiene comportamiento anti-MAG, alteraciones renales o amiloidosis. Finalmente, puede haber poliartralgia, edema angioneurótico y malabsorción intestinal. El síndrome de Schnitzler es una urticaria crónica por depósito intradérmico de IgM que se trata con anakinra (anti-IL-6)[4].

› Hallazgos biológicos

En el hemograma, el 50-70% de los enfermos tiene anemia de etiopatogenia múltiple. No suele haber anomalías de leucocitos, pero hay linfocitosis monoclonal en el 20% de los pacientes. Neutropenia y trombopenia aparecen en < 20% de los casos, generalmente leves. En el frotis es característico el hallazgo de hematíes apilados por la paraproteinemia (fenómeno de Rouleaux). La bioquímica de los pacientes con MW suele ser normal. Hay hipergammaglobulinemia monoclonal y VSG aumentada. La IgM está elevada y se identifica bien por inmunoelectroforesis o inmunofijación. No suele haber inmunoparesia[4]. La proteinuria de Bence-Jones es poco frecuente (< 30%) y escasa (< 2 g/24 horas). Las cadenas ligeras libres (FLC) son menos útiles en MW que en mieloma múltiple (MM), aunque pueden tener valor pronóstico.

El inmunofenotipo de la MW no es patognomónico, pero facilita el diagnóstico. En la MO es característica la coexistencia de CP y linfoplasmocitos cuyo patrón es $CD19^{++}$, $CD20^{++}$, $CD22^{+}$, $CD79a^{+}$, $sIgM^{+}$, $cIgM^{+}$, $CD5^{-}$, $CD23^{-}$, $CD103^{-}$, $CD11c^{-}$, $CD10^{-}$, $CD25^{+}$, $CD22^{+débil}$[9]. El perfil de la CP en la MW es $CD38^{++}CD19^{++/-}CD56^{-}$ $CD45^{++}$ $CD20^{+}$, casi normal, salvo por restricción de cadena ligera.

El 22-60% de los casos tienen del(6q), siendo más raras otras alteraciones: translocaciones IgH, del(13q) y del(17p). El gen *MYD88* está mutado en > 90% de los casos, casi siempre como L265P. También está presente en el 50-80% de las gammapatías monoclonales de significado incierto (GMSI) de tipo IgM, 2% de las LLC y 20% de linfomas difusos de célula B grande (sobre todo de tipo ABC). CXCR4 está mutado en el 40% de los casos.

La MW tiene un curso crónico y progresivo, con una supervivencia media superior a 5 años y con, al menos, un 30% de los pacientes vivos a los 10 años del diagnóstico. El International Prognostic Scoring System (IPSS) incluye 5 variables con mal pronóstico: anemia (hemoglobina –Hb– ≤ 115 g/L), trombopenia (≤ 100 × 10^9/L), componente M > 70 g/L, edad > 65 años y β2-microglobulina > 3 mg/L.

› Tratamiento

Los criterios de tratamiento se basan en la aparición de algunos de los siguientes síntomas o signos: 1) sín-

tomas B o fatiga; 2) hiperviscosidad; 3) linfadenopatía sintomática o voluminosa (≥ 5 cm); 4) hepatomegalia y/o esplenomegalia sintomática; 5) organomegalia sintomática y/o infiltración de tejidos y órganos; 6) neuropatía periférica por MW; 7) crioglobulinemia sintomática; 8) anemia por crioaglutinina; 9) trombocitopenia y/o anemia hemolítica inmune; 10) nefropatía relacionada con MW; 11) amiloidosis relacionada con MW; 12) Hb ≤ 10 g/dL; y 13) recuento de plaquetas < 100 × 10^9/L.

Hay 2 grupos de fármacos para la MW[10]: 1) tradicionales, con anti-CD20 solo o en asociación, incluyendo alquilantes, bendamustina o inhibidores del proteasoma; y 2) nuevos, que incluyen inhibidores de la tirosina cinasa de Bruton (BTK) (ibrutinib, acalabrutinib y zanubrutinib), inmunomoduladores e inhibidores de *mTOR*. Se puede considerar también el mantenimiento y el trasplante. El último consenso da como primera opción de tratamiento anti-CD20, en monoterapia, o mejor combinado, para el tratamiento de primera línea en pacientes con MW. Si los pacientes no son candidatos a quimioinmunoterapia, se puede usar ibrutinib. El tratamiento de rescate se basa en los mismos fármacos, variando si la recaída es tardía o precoz, o hay resistencia primaria. En el primer caso, se reutiliza el mismo agente si la respuesta fue buena, aunque se puede cambiar. En el segundo caso es necesario cambiar, pero aquí es muy recomendable usar ibrutinib, el mejor fármaco por ahora en segunda línea.

Rituximab solo consigue respuestas del 30-60% y es poco tóxico, pero las respuestas son cortas (7-16 meses)[10]. Además, las respuestas tardan y se han descrito aumentos transitorios iniciales en la IgM (*flare* o "llamarada") que duran 1-3 meses. Hay que prevenir síntomas por hiperviscosidad y no hay que interpretar erróneamente este fenómeno como progresión. Ofatumumab se puede usar si hay intolerancia al rituximab.

Para combinar con rituximab, el fármaco preferido es la ciclofosfamida, incluso con purinas, con respuestas globales > 90%, incluso completas (~ 20%), aunque con mucha toxicidad. Con R-CHOP las respuestas globales (RG) son del 91% (9% completas), con > 4 años de duración. No obstante, sin adriamicina y vincristina la eficacia es semejante y la toxicidad menor. El esquema más común es DRC: respuesta global del 83% (7% de respuestas completas –RC–) y supervivencia libre de progresión (SLP) del 80% a 2 años. Rituximab y bendamustina (R-benda) proporciona respuestas del 95% con SLP de 69 meses. Sin embargo, puede producir neutropenias y no es infrecuente tener que usar 4 ciclos en lugar de los 6 recomendados. En segunda línea, R-benda obtiene respuestas en torno al 80%, de más de 2 años de duración. Rituximab con bortezomib en segunda línea obtiene respuestas cercanas al 70%, mientras que, en primera línea, el esquema BDR (añade dexametasona) da respuestas del 85% (~ 20% RC) y SLP de 43 meses[10]. Dado que con bortezomib puede haber neurotoxicidad, también se puede usar carfilzomib que, combinado con rituximab y dexametasona, arroja resultados sin neurotoxicidad y RG del 87%, con una SLP > 65% a los 15 meses.

Las altas dosis de quimioterapia y el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) autólogo o alogénico son factibles, pero resulta muy complejo interpretar sus resultados. Deben ser considerados como una alternativa posible en MW a partir de la segunda o la tercera líneas.

En cuanto a los nuevos tratamientos, aunque hay varias posibilidades (inmunomoduladores, inhibidores de mTOR, inhibidores de BLC2), solo hablaremos de los inhibidores de BTK. Ibrutinib es el primero disponible, muy eficaz en síndromes linfoproliferativos similares. La mutación MYD88 L265P es un potente estimulante del BCR, favoreciendo una sobreactivación de BTK y la vía de NFκB, por lo que sus inhibidores están muy justificados en MW. Treon *et al.*[11] mostraron excelentes resultados con ibrutinib en 63 pacientes sintomáticos que habían recibido al menos una línea de tratamiento. La RG fue del 91%, con una proporción de respuestas parciales (RP) del 73%, SLP del 69% y una supervivencia global (SG) del 95% a los 2 años. La toxicidad fue baja, con neutropenia y trombocitopenia de grados 2-3 en el 22 y el 14% de los pacientes, respectivamente. Esta eficacia y tolerancia fue confirmada después en el estudio *INNOVATE* con ibrutinib como agente único en 31 pacientes con MW en recaída/refractaria (RG del 90%, con SLP y SG a 18 meses del 86 y el 97%, respectivamente; y del 61 y el 84% a los 3 años)[12]. Estos resultados motivaron un ensayo fase III que comparó un grupo control tratado con rituximab y otro con rituximab más ibrutinib. Las respuestas fueron superiores con ibrutinib (globales: 95 *vs.* 48%; mayores: 78 *vs.* 32%), así como la SLP (76 *vs.* 31% a 3 años), aunque todavía es pronto para ver diferencias en SG (93 *vs.* 90%; p > 0,05)[13]. Los resultados son mejores en los pacientes MYD88 positivos y peores en los CXCR4 positivos.

› Bibliografía

1. Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, Fonseca R, Greipp PR, McMaster ML, et al. Clinicopathological definition of Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. Semin Oncol. 2003 Apr;30(2):110-5.
2. Castillo JJ, Garcia-Sanz R, Hatjiharissi E, Kyle RA, Leleu X, McMaster M, et al. Recommendations for the diagnosis and initial evaluation of patients with Waldenstrom Macroglobulinaemia: a Task Force from the 8th International Workshop on Waldenstrom Macroglobulinaemia. Br J Haematol. 2016 Oct;175(1):77-86.
3. Waldenström J. Incipient myelomatosis or "essential" hyperglobulinemia with fibrinogenopenia — a new syndrome? Acta Medica Scandinavica. 1944;117(3-4):31.
4. García-Sanz R, Montoto S, Torrequebrada A, de Coca AG, Petit J, Sureda A, et al.; Spanish Group for the Study of Waldenström Macroglobulinaemia and PETHEMA (Programme for the Study and Treatment of Haematological Malignancies). Waldenstrom macroglobulinaemia: presenting features and outcome in a series with 217 cases. Br J Haematol. 2001 Dec;115(3):575-82.
5. Jiménez C, Alonso-Álvarez S, Alcoceba M, Ordóñez GR, García-Álvarez M, Prieto-Conde MI, et al. From Waldenstrom's macroglobulinemia to aggressive diffuse large B-cell lymphoma: a whole-exome analysis of abnormalities leading to transformation. Blood Cancer J. 2017 Aug 25;7(8):e591.
6. Hunter ZR, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. The genomic landscape of Waldenstrom macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. Blood. 2014 Mar 13;123(11):1637-46.
7. Jiménez C, Prieto-Conde MI, García-Álvarez M, Alcoceba M, Escalante F, Chillón MDC, et al. Unraveling the heterogeneity of IgM monoclonal gammopathies: a gene mutational and gene expression study. Ann Hematol. 2018 Mar;97(3):475-84.
8. Castillo JJ, D'Sa S, Lunn MP, Minnema MC, Tedeschi A, Lansigan F, et al. Central nervous system involvement by Waldenstrom macroglobulinaemia (Bing-Neel syndrome): a multi-institutional retrospective study. Br J Haematol. 2016 Mar;172(5):709-15.
9. Paiva B, Montes MC, García-Sanz R, Ocio EM, Alonso J, de Las Heras N, et al. Multiparameter flow cytometry for the identification of the Waldenstrom's clone in IgM-MGUS and Waldenstrom's Macroglobulinemia: new criteria for differential diagnosis and risk stratification. Leukemia. 2014;28(1):166-73.
10. García-Sanz R, Jiménez C, González de la Calle V, Sarasquete ME. A safety profile of medications used to treat Waldenstrom's macroglobulinemia. Expert Opin Drug Saf. 2018;17(6):609-21.
11. Treon SP, Tripsas CK, Meid K, Warren D, Varma G, Green R, et al. Ibrutinib in previously treated Waldenstrom's macroglobulinemia. N Engl J Med. 2015;372(15):1430-40.
12. Dimopoulos MA, Trotman J, Tedeschi A, Matous JV, Macdonald D, Tam C, et al. Ibrutinib for patients with rituximab-refractory Waldenstrom's macroglobulinaemia (iNNOVATE): an open-label substudy of an international, multicentre, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2017;18(2):241-50.
13. Dimopoulos MA, Tedeschi A, Trotman J, García-Sanz R, Macdonald D, Leblond V, et al. Phase 3 Trial of Ibrutinib plus Rituximab in Waldenstrom's Macroglobulinemia. N Engl J Med. 2018;378(25):2399-410.

TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA EN LA ERA MOLECULAR

Coordinadores: **Dr. Pau Montesinos Fernández.** Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Valencia
Dr. Jordi Esteve Reyner. Hospital Clínic. Barcelona

El avance hacia la curación de la LMA pasa ineludiblemente por la comprensión de los mecanismos moleculares que conducen a la leucemogénesis y la identificación de dianas genéticas, que permitan el desarrollo de drogas menos tóxicas y más selectivas. Pero también será fundamental la comprensión de los mecanismos ligados al desarrollo de resistencia leucémica a los agentes quimioterápicos clásicos, y para ello podría resultar muy informativa la identificación y caracterización de las clonas residuales leucémicas que persisten tras obtener RC tras quimioterapia. En definitiva, se debe caminar hacia un modelo de medicina de precisión, tratando a cada tipo de LMA según sus características moleculares y su perfil de sensibilidad a los diferentes fármacos disponibles. Para todo ello, es imprescindible aunar esfuerzos entre las diferentes instituciones y laboratorios para el diagnóstico rápido, homogéneo y optimizado de todos estos aspectos biológicos de la LMA. Con el fin de poder sacar conclusiones sobre la utilidad de estas nuevas técnicas diagnósticas, los pacientes deberían ser tratados homogéneamente siguiendo protocolos asistenciales nacionales con los esquemas clásicos, o bien en ensayos clínicos con nuevos agentes anti-leucémicos.

En los últimos años se han producido importantes avances en las técnicas diagnósticas de alto rendimiento que permiten una mejor caracterización molecular de la LMA, y han desvelado un nuevo escenario en el que, en cada paciente, estarían presentes numerosas mutaciones somáticas: de estas, unas pocas serían recurrentes y afectarían a un número reducido de genes mientras que la gran mayoría serían casi exclusivas de cada paciente o se presentarían en muy baja frecuencia. Además a esto se une una importante heterogeneidad clonal que complica aún más este panorama. Por todo lo expuesto, se hace necesario integrar esta compleja información molecular para establecer biomarcadores que ayuden en el diagnóstico precoz, la estratificación de los pacientes según su riesgo, predicción de respuesta a fármacos y, finalmente, a la identificación de terapias dirigidas. Sin embargo, a día de hoy no hay resultados concluyentes sobre cómo incorporar el perfil genético completo del paciente en la práctica clínica de la LMA.

Se están desarrollando nuevos fármacos con diversos mecanismos de acción que podrían significar un cambio en el manejo y en el pronóstico de la LMA. Se están desarrollando varios estudios con pequeñas moléculas que inhiben selectivamente la acción de proteínas responsables de la proliferación y supervivencia de las células leucémicas. Los inhibidores de tirosín kinasas tipo 3 (FLT3) son los que más recorrido tienen y los que parecen tener un efecto antileucémico más acusado frente a las células con la mutación de FLT3. También parece que los inhibidores de IDH1 e IDH2 puedan ser una nueva alternativa de tratamiento, en monoterapia o en combinación, con múltiples ensayos en desarrollo. Otros fármacos que han mostrado un aparente efecto antileucémico en estas fases precoces de desarrollo son los inhibidores de BCL2 (venetoclax), y de vía hedge-hog (glasdegib). Cabe mencionar además el estudio de inhibidores de MDM2 y HDM2 que podrían aportar alguna ventaja y están en pleno desarrollo. Otro campo interesante de desarrollo en la LMA es la inmunoterapia, especialmente los monoclonales duales (DART) que han mostrado datos muy interesantes en pacientes en recaída refractariedad (anti-CD3/CD123).

En los próximos años sabremos si estas nuevas drogas dirigidas a dianas moleculares mejoran las expectativas de los pacientes con LMA. Para este simposio contaremos con tres distinguidos ponentes que nos darán su perspectiva sobre el tratamiento y el manejo de la LMA en la era molecular.

Estrategias curativas adaptadas al riesgo en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda: presente y futuras direcciones

Miguel A. Sanz
Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia

› Introducción

La adaptación del tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA) a determinadas características del paciente, como la edad, el estado clínico y las comorbilidades al diagnóstico, los antecedentes de enfermedades hematológicas previas, de las células leucémicas, como las alteraciones genéticas, y a la calidad de la respuesta al tratamiento ha sido un constante objetivo de investigación clínica con el propósito de optimizar los resultados terapéuticos. Ya desde los albores del tratamiento quimioterápico, la demostración de una mayor vulnerabilidad de los pacientes mayores a los efectos tóxicos de la quimioterapia, pero también de los pacientes más jóvenes cuando presentan muy mal estado clínico o con importantes comorbilidades, pronto llevó a una reducción de la intensidad del tratamiento quimioterápico en estos pacientes o incluso a desaconsejar cualquier tratamiento si el riesgo de muerte tóxica era inasumible. Desde entonces hasta la actualidad, hemos encontrado que también determinados tratamientos logran su efecto óptimo en pacientes con alguna peculiaridad fenotípica y/o genotípica. En esta revisión, analizaremos los subgrupos de pacientes con LMA actualmente reconocibles que serían subsidiarios de tratamientos potencialmente curativos adaptados al riesgo o dirigidos a dianas moleculares.

› Subgrupos reconocibles en la leucemia mieloide aguda para un tratamiento adaptado con intención curativa

La primera aproximación a un paciente con LMA debe determinar si su estado físico y funcional le permite someterse al riesgo de los efectos tóxicos de la quimioterapia. Esquemáticamente, los pacientes se considerarán adecuados para soportar un tratamiento intensivo, un tratamiento de intensidad mediana o un tratamiento meramente paliativo debido principalmente a su edad, su estado clínico y la presencia de comorbilidades. Tras esta primera aproximación, que determinará el tipo y la intensidad del tratamiento a administrar, otras características podrían merecer adaptaciones terapéuticas en los pacientes *fit* para optimizar la eficacia y el potencial de curación con el uso de algunos nuevos fármacos actualmente disponibles. Dejando aparte los pacientes frágiles y vulnerables no subsidiarios de tratamientos intensivos con intención curativa, en la Tabla 1 se muestran las posibles opciones terapéuticas a considerar en determinados subgrupos de riesgo actualmente reconocibles.

Tabla 1. Posibles opciones terapéuticas adaptadas al riesgo para pacientes *fit*

Subgrupo de LMA	Opciones terapéuticas	Comentario
LMA-CBF	• "3 + 7" + gemtuzumab ozogamicina • FLAG/FLAG-IDA + gemtuzumab ozogamicina	Estas opciones terapéuticas pueden considerarse en pacientes con citogenética intermedia
sLMA	• CPX-351	
LMA con *FLT3* mutado	• "3 + 7" + midostaurina	
LMA con IDH1 mutado	• "3 + 7" + ivosidenib	
LMA con IDH2 mutado	Ivosidenib "3 + 7" + enasidenib	

CBF: *core binding factor*; LMA: leucemia mieloide aguda; sLMA: LMA secundaria

› *Pacientes con leucemia mieloide aguda secundaria*

Los pacientes con una LMA secundaria (sLMA) tras un síndrome mielodisplásico o mieloproliferativo, o como una complicación tardía de la quimioterapia o la radiación ionizante recibida por otra enfermedad, representan aproximadamente un cuarto de todos los pacientes con LMA y se presentan con mayor frecuencia en edades avanzadas. Además de la edad, la sLMA también se asocia con características biológicas que contribuyen a un peor pronóstico que las LMA *de novo*, especialmente con una mayor frecuencia de alteraciones genéticas adversas. Sin embargo, paradójicamente, en un reciente estudio aleatorizado que compara un esquema de quimioterapia intensiva con "3 + 7" estándar de daunorubicina y citarabina con CPX-351 (Vyxeos®), una formulación liposómica que contiene daunorubicina y citarabina en una proporción 1:5 molar de ambos fármacos, se demostró una ventaja terapéutica significativa de CPX-351 precisamente en los pacientes con sLMA, particularmente si recibían un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos[1]. Este estudio ha llevado a la reciente aprobación de CPX-351 por la Food and Drug Administration (FDA) en los EE.UU. y la European Medicines Agency (EMA) en la Unión Europea para el tratamiento de los pacientes con sLMA.

› *Pacientes con leucemia mieloide aguda-CBF*

Este subgrupo de enfermos portadores de alteraciones genéticas que incluyen la inv(16) y la t(16;16), con su correspondiente gen de fusión *CBFB/MYH11* (*core-binding factor, beta/myosin heavy chain 11*), así como la t(8;21) con el correspondiente gen de fusión *RUNX1 –runt-related transcription factor 1–/RUNX1T1*, representa las denominadas LMA-CBF (*core binding factor*). Tradicionalmente, en este subgrupo de LMA se alcanzan unos resultados excelentes a largo plazo con esquemas terapéuticos basados en inducción "3 + 7", con daunorubicina y citarabina, seguidos de 3-4 ciclos de consolidación con altas dosis de citarabina (AD/ara-C), sin necesidad de recurrir al trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Estudios recientes sugieren una ventaja terapéutica con el uso de esquemas de inducción basados en fludarabina (FLAG) seguidos de ciclos de consolidación AD/ara-C[2]. La adición de gemtuzumab ozogamicina (GO) o idarubicina (Ida) con FLAG también parece mejorar los resultados en este grupo de LMA-CBF[3,4]. Finalmente, un metaanálisis de 5 ensayos aleatorizados que combinan quimioterapia intensiva con GO en inducción demostró un beneficio significativo en la supervivencia de los pacientes con citogenética favorable e intermedia, aunque la ventaja fue mucho más aparente en los primeros[5]. Este estudio también ha llevado a la reciente aprobación de GO para esta indicación, tanto por la FDA como por la EMA.

› *Pacientes con mutaciones de* FLT3

El gen *FLT3* (*FMS-like tyrosine kinase 3*) es el más frecuentemente mutado en la LMA, en su mayoría como una duplicación interna en tándem (*FLT3-ITD*), como una mutación en el dominio tirosina cinasa (*FLT3-TKD*) y ocasionalmente con otro tipo de mutaciones que afectan a dicho gen. Estas mutaciones, particularmente la mutación *FLT3-ITD*, están asociadas con hiperleucocitosis, mayor tasa de recaídas y menor supervivencia. Entre los diversos inhibidores de *FLT3* que se han desarrollado, midostaurina, que como agente único había demostrado una actividad modesta pero con una marcada reducción de blastos circulantes, ha sido el primer inhibidor de *FLT3* en demostrar en un estudio aleatorizado fase 3 un impacto favorable en la supervivencia[6]. El ensayo clínico *RATIFY* realizó un análisis mutacional en 3.277 pacientes con LMA con edad entre 18 y 59 para seleccionar 717 pacientes con mutaciones *FLT3-ITD* y/o *FLT3-TKD,* que fueron tratados con quimioterapia intensiva estándar (inducción con daunorubicina y citarabina en esquema "3 + 7" y consolidación con AD/ara-C) con la adición aleatorizada de midostaurina o placebo. Los pacientes en remisión tras la consolidación continuaban con tratamiento de mantenimiento de un año con midostaurina o placebo. La supervivencia global, que fue el objetivo primario del estudio, y la supervivencia libre de eventos fueron significativamente superiores en el grupo tratado con midostaurina en comparación con el placebo. La proporción de eventos adversos, sin embargo, fue similar en ambos grupos. Los resultados de este estudio han llevado a la aprobación de midostaurina por la FDA y la EMA para los pacientes con LMA portadores de una mutación de *FLT3*.

Además de midostaurina, otros inhibidores de *FLT3*, como sorafenib, quizartinib, crenolanib y gilteritinib, es-

tán actualmente en distintas fases de desarrollo con resultados muy prometedores.

› *Pacientes con mutaciones de* IDH

Otras mutaciones conductoras (*driver*) como las *IDH* (*isocitrate dehydrogenase*) parecen también constituir una buena diana genética con el uso de inhibidores de IDH1 e IDH2. De hecho, 2 de estos inhibidores, ivosidenib y enasidenib, han sido también recientemente aprobados por la FDA para pacientes con LMA con IDH1 mutado e IDH2 mutado, respectivamente. Ambos inhibidores fueron primero aprobados para pacientes con LMA refractaria o en recaída con mutaciones IDH1[7] o IDH2[8,9]. En mayo de 2019, la FDA ha extendido la aprobación de ivosidenib en monoterapia para pacientes con IDH1 mutado en LMA de nuevo diagnóstico ≥ 75 años o con comorbilidades que les impiden ser tratados con quimioterapia[10]. Finalmente, los resultados de un estudio fase 1 con ivosidenib y enasidenib combinados con quimioterapia intensiva estándar en inducción y consolidación en pacientes LMA de nuevo diagnóstico (NCT02632708) han demostrado un aceptable perfil de seguridad y unas robustas tasas de remisión hematológica y negativización de la enfermedad mínima residual que garantizan su evaluación en un ensayo fase 3[11].

› Conclusiones

Las estrategias curativas adaptadas al riesgo en el tratamiento de los pacientes con LMA han sufrido una rápida transformación en los últimos 2-3 años con la demostración de la ventaja terapéutica de algunos nuevos fármacos en diversas categorías de pacientes con esta enfermedad. En esta revisión se analizan los nuevos agentes que se han incorporado muy recientemente, o están a punto de incorporarse, a los algoritmos de decisión terapéutica de los pacientes con LMA, como es el caso de gemtuzumab ozogamicina en los pacientes sin alteraciones citogenéticas desfavorables que expresan CD33, muy especialmente en las LMA-CBF. CPX-351 también se ha incorporado como la primera opción terapéutica en los pacientes con sLMA. Finalmente, midostaurina en combinación con quimioterapia intensiva estándar constituye el primer ejemplo de terapia dirigida a una diana molecular (*targeted therapy*) al que se presume seguirán pronto otros inhibidores de *FLT3* para los pacientes portadores de estas mutaciones. Esto ha supuesto un cambio de paradigma, siendo los inhibidores de IDH1 e IDH2, tales como ivosidenib y enasidenib, los últimos en incorporarse a esta categoría de nuevos agentes aprobados para la LMA. No es difícil imaginar, dado el momento expansivo de desarrollo de nuevos agentes inhibidores de los mecanismos moleculares implicados en estas y otras mutaciones presentes en la LMA, que el tratamiento de los pacientes con LMA va a ofrecer una amplia gama de opciones terapéuticas cada vez más eficaces.

› Bibliografía

1. 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 Sep 10;36(26):2684-92.
2. Borthakur G, Kantarjian H, Wang X, Plunkett WK, Gandhi VV, Faderl S, et al. Treatment of core-binding-factor in acute myelogenous leukemia with fludarabine, cytarabine, and granulocyte colony-stimulating factor results in improved event-free survival. Cancer. 2008 Dec 1;113(11):3181-5.
3. Borthakur G, Cortes JE, Estey EE, Jabbour E, Faderl S, O'Brien S, et al. Gemtuzumab ozogamicin with fludarabine, cytarabine, and granulocyte colony stimulating factor (FLAG-GO) as front-line regimen in patients with core binding factor acute myelogenous leukemia. Am J Hematol. 2014 Oct;89(10):964-8.
4. Burnett AK, Hills RK, Milligan D, Kjeldsen L, Kell J, Russell NH, et al. Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRC AML15 trial. J Clin Oncol. 2011 Feb 1;29(4):369-77.
5. Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, Delaunay J, Petersdorf S, Othus M, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. Lancet Oncol. 2014 Aug;15(9):986-96.
6. 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 Aug 3;377(5):454-64.
7. 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 Jun 21;378(25):2386-98.
8. Stein EM, Dinardo CD, Pollyea DA, Fathi AT, Roboz GJ, Altman JK, et al. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. Blood. 2017 Aug 10;130(6):722-31.
9. Stein EM, Dinardo CD, Fathi AT, Pollyea DA, Stone RM, Altman JK, et al. Molecular remission and response patterns in patients with mutant-IDH2 acute myeloid leukemia treated with enasidenib. Blood. 2019 Feb 14;133(7):676-87.

10. Agios Announces FDA Approval of Supplemental New Drug Application (sNDA) for TIBSOVO® as Monotherapy for Newly Diagnosed Adult Patients with IDH1 Mutant Acute Myeloid Leukemia (AML) Not Eligible for Intensive Chemotherapy. Agios. Published May 2, 2019. https://bit.ly/2DNjOkV. Accessed May 2, 2019.

11. Stein EM, Dinardo CD, Fathi AT, Mims AS, Pratz KW, Savona MR, et al. Ivosidenib or Enasidenib Combined with Induction and Consolidation Chemotherapy in Patients with Newly Diagnosed AML with an IDH1 or IDH2 Mutation Is Safe, Effective, and Leads to MRD-Negative Complete Remissions. Blood. 2018 Nov 21;132(Suppl 1):560.

AVANCES EN ERITROPATOLOGÍA

Coordinadores: **Dra. Beatriz Arrizabalaga Amuchástegui.** Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Bizkaia
Dra. Ana Villegas Martínez. Hospital Clínico San Carlos, Madrid

En este simposio se van a revisar fundamentalmente novedades terapéuticas en 3 temas de gran interés clínico en el mundo de la Eritropatología: talasemia y drepanocitosis por el Dr. Rafael del Orbe, púrpura trombótica trombocitopénica por el Dr. Ataúlfo González y enfermedad por aglutininas frías, por la Dra. Montserrat López Rubio.

El **Dr. del Orbe** hace una revisión exhaustiva de los posibles tratamientos en talasemias y drepanocitosis. La posibilidad curativa de ambas hemoglobinopatías reside actualmente en el alo-trasplante y en este trabajo se revisan los buenos resultados cuando proceden de hermanos compatibles y los avances en la última década utilizando otras fuentes. Sin embargo la esperanza del tratamiento curativo futuro en estas enfermedades monogénicas parece residir en la terapia génica, de hecho, el tema "Terapia génica en hemoglobinopatías" se desarrolla de forma específica en otro simposio de este Congreso. Como explica el Dr. del Orbe además de la transferencia del gen β globina normal en un lentivirus, también existe la posibilidad de modificar el propio ADN por técnicas de edición génica (CRISPR/CAS9…). También revisa los nuevos fármacos en desarrollo que actúan en diferentes dianas de la complicada fisiopatología de estas hemoglobinopatías. En el área de la talasemias: luspatercept/sotatercept mejorando la eritropoyesis efectiva y rapamicina aclarando las sobrantes cadenas α-globina. En el área de la drepanocitosis: fármacos que incrementan la Hb fetal, fármacos antifalciformación (Voxelotor …), fármacos antioxidantes como L-glutamina ya aprobada por la FDA, fármacos inhibidores de la adhesión a la pared vascular (crizanlizumab …) y los nuevos fármacos de acción antitrombótica –antiinflamatoria.

En la púrpura trombótica trombocitopénica (PTT) el tratamiento, como señala el **Dr. González**, es una emergencia terapéutica, dado que la mitad de las muertes se producen en las primeras 24 horas. Se analizan desde los tratamientos clásicos como plasmaféresis, corticoides o esplenectomía, hasta las nuevas estrategias terapéuticas basadas en la fisiopatología de la PTT, como rituximab, caplazizumab o ADAMTS 13 recombinante. El recambio plasmático con plasmaféresis (RP) debe de iniciarse precozmente, aporta grandes volúmenes de ADAMTS 13, y además elimina Ac anti-ADAMTS 13 y multímeros del factor Willebrand (ULFvw). Un apoyo importante en la terapia de la PTT es el empleo de rituximab, que está jugando un papel importante en la PTT refractaria al tratamiento o en recaída, con altas tasas de respuesta. Estos resultados hacen que incluso se utilice en las fases precoces, así las Guías Británicas lo recomiendan en los estadios iniciales del tratamiento junto con RP y corticoides. Pero según comentará, muchas cuestiones quedan abiertas en relación con su uso: ¿debe de instaurarse precozmente o solo en pacientes refractarios? ¿Debe ser utilizada en terapéutica preventiva? Cuál es la administración óptima?

Otro gran avance significativo ha sido la aprobación por FDA y EMA del Ac monoclonal caplacizumab, que evita la aglutinación de las plaquetas en la microcirculación, al bloquear la interacción del FvW con el receptor plaquetario GPIb-IX-V. En ensayos en fase II y III ha conseguido disminuir el tiempo de recuperación de plaquetas, y mejorar los biomarcadores de daño orgánico.

En la PTT congénita el ADAMTS recombinante puede ser una promesa significativa del futuro tratamiento.

En el tema de 'Avances en la Enfermedad por Aglutininas frías' las doctoras **López Rubio y Gutiérrez Jomarron** nos introducen en la consideración que cuando son primarias (*cold aglutinin disease*) no es solo una anemia hemolítica sino un síndrome linfoproliferativo B con CM Ig M-Kappa. Se explica la patogenicidad de las crioaglutininas (hemólisis y acrocianosis) y porqué el test de Coombs es positivo para C3d y porqué la hemólisis es principalmente extravascular a nivel hepático.

Respecto al tratamiento farmacológico, debe ser una opción individualizada según la severidad de la anemia y los síntomas vasculares, evitando terapias ineficaces utilizadas en el pasado como corticoides o esplenectomía. La elección en primera línea es rituximab sola o asociada con bendamustina, que ha mejorado la tasa de respuesta sin la toxicidad infecciosa que produce la asociación con fludarabina. Respecto a los nuevos fármacos inhibidores del complemento (C1-INH, anti C5 eculizumab…), por ahora solo el sutimlimab/BIVV009 (Ac monoclonal sobre C1s) ha entrado en un ensayo fase 3.

Por último, las autoras revisan las enfermedades malignas/infecciones que provocan de forma secundaria hemolisis por crioaglutininas y también hacen una revisión del comportamiento peculiar de la crioaglutinina, que causa la rara entidad de la hemoglobinuria paroxística *a frigore*.

Novedades terapéuticas en talasemias y drepanocitosis

Rafael del Orbe Barreto
Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Bizkaia

Las talasemias y la drepanocitosis son las hemoglobinopatías mas graves producidas por mutaciones en el gen que codifica la síntesis de cadenas beta de globina (*HBB*). Por una parte, las betatalasemias pueden ser originadas por cientos de mutaciones diferentes; sin embargo, la anemia de células falciformes (ACF) o drepanocitosis se origina por la sustitución de un nucleótido único que condiciona el cambio del aminoácido ácido glutámico por valina en la posición 6 de la cadena beta, originando la hemoglobina S (HbS).

› Avances en el tratamiento de las talasemias

Las talasemias son un grupo heterogéneo de hemoglobinopatías cuantitativas, causadas por el desbalance de cadenas de globina, que conduce a eritropoyesis ineficaz por el depósito de la cadena excedente en el citoplasma del eritroblasto. Pueden presentarse formas leves de betatalasemia (heterocigotas) que son clínicamente asintomáticas, mientras que los casos graves pueden presentar dependencia transfusional y desarrollar sobrecarga férrica secundaria tanto al tratamiento de soporte como por aumento de la absorción de hierro a nivel intestinal. Durante las últimas décadas, la esperanza y la calidad de vida de estos pacientes ha mejorado notablemente gracias a los avances de la terapia quelante de hierro, principalmente tras la introducción de formulaciones orales. De manera consecuente, el envejecimiento de los pacientes talasémicos se ha traducido en la aparición de nuevas comorbilidades que requieren de nuestra atención.

Durante los últimos años, se han reportado los resultados de diferentes ensayos clínicos en formas graves de betatalasemia, enfocados principalmente al tratamiento sintomático, entre ellos:

• **Inducción de la hemoglobina fetal** (HbF). Se ha utilizado la hidroxiurea (HU) en betatalasemia no dependiente de transfusión (NTDT), aunque con resultados no tan buenos como en anemia falciforme. Otro enfoque es inducir el aumento de la HbF mediante edición génica del gen supresor de la síntesis de cadenas gamma (BCL11A) o del promotor de los genes que codifica la síntesis de cadenas gamma con el uso de tecnología CRISPR/CAS9, aunque todavía se encuentra en fase preclínica.

• **Estimuladores de la eritropoyesis efectiva**. En pacientes con NTDT, los niveles de eritropoyetina (EPO) disminuyen con la edad. Se han reportado respuestas variables a la EPO en casos de betatalasemia dependiente de transfusión (TDT) y NTDT. Actualmente, se encuentra activo un ensayo clínico en fase 1 que utiliza EPO pegilada (NCT02950857), pero se cree que pudiera incrementar el riesgo de hematopoyesis extramedular si es utilizada sola. Por otra parte, el uso de inhibidores del JAK2 puede disminuir la eritropoyesis ineficaz, mejorando el balance entre proliferación y diferenciación. Los resultados del ensayo clínico fase 2 de ruxolitinib no demostraron una reducción en el número de transfusiones, aunque sí una reducción de la esplenomegalia, por lo cual pudiera ser de utilidad para este fin. Los agentes maduradores eritroides luspatercept y sotatercept se unen de manera selectiva al ligando del TGF-beta reduciendo la señalización Smad2/3 aberrante, mejorando la maduración eritroide. El estudio *BELIEVE* (ensayo clínico fase 3) ha demostrado un incremento de la hemoglobina y una disminución de los requerimientos transfusionales en pacientes con TDT y NTDT con el uso de luspatercept.

• **Restricción férrica**. La infusión de transferrina, el uso de minihepcidinas o el aumento de la síntesis de hepcidina endógena (supresión de matriptasa) consiguen mejorar la eritropoyesis en modelos murinos; sin embargo, aún no se cuenta con ensayos clínicos aleatorizados.

• **Aclaramiento de cadenas alfa-globina**. El exceso de cadenas de alfa-globina forma precipitados

tóxicos en los hematíes y sus precursores, produciendo eritropoyesis ineficaz, aborto medular y hemólisis. La rapamicina (inhibidor de la vía m-TOR) reduce los precipitados de cadenas alfa-globina, disminuye la eritropoyesis ineficaz y aumenta la vida media de los hematíes en modelos murinos de betatalasemia.

En la actualidad, el único tratamiento curativo de la betatalasemia disponible en la práctica habitual es el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). Desde la década de los ochenta hasta la actualidad se han venido mejorando los regímenes de acondicionamiento, la estratificación de grupos de riesgo y, gracias al avance del tratamiento de soporte, ha disminuido notablemente la mortalidad relacionada con el procedimiento, siendo inferior al 10% en pacientes menores de 14 años. En el caso de los TPH de donantes no emparentado (DnE), la introducción de acondicionamientos basados en treosulfán ha conseguido mejorar la supervivencia con una mortalidad similar a la del alo-TPH de hermano compatible. El trasplante de cordón umbilical no ha mostrado beneficios, ya que presenta una mayor frecuencia de fallo del injerto. Respecto al TPH haploidéntico, que amplía considerablemente la disponibilidad de donante, presenta una mejoría progresiva de sus resultados gracias a la manipulación del inóculo.

La terapia génica en betatalasemia puede llegar a ser otra opción de tratamiento curativo en el futuro, aunque todavía se encuentra en fase de ensayo clínico. Consiste en realizar un TPH autólogo, con infusión de células CD34+ modificadas genéticamente mediante la inoculación de un vector vírico (lentivirus) que lleva el gen que codifica la síntesis de la cadena beta-globina deficitaria. Los resultados del ensayo clínico *Northstar* que evalúa la eficacia del lentivirus BB305 han mostrado resultados prometedores, donde se observa independencia transfusional en un número considerable de pacientes y sin efectos secundarios graves tras más de 3 años de seguimiento.

› Avances en el tratamiento de la drepanocitosis

Agruparemos los tipos de tratamientos según las dianas terapéuticas o los mecanismos fisiopatológicos hacia los que van dirigidos. Los tratamientos primarios son aquellos orientados a corregir o eliminar la mutación que origina la HbS o evitar su polimerización, que es la primera etapa en la cascada fisiopatológica de la ACF, y los tratamientos secundarios van enfocados a paliar las secuelas del problema raíz, es decir, la polimerización de la HbS.

› *Tratamientos primarios*

Entre los tratamientos primarios que pretenden ser curativos encontramos el TPH de un hermano compatible, que es actualmente la terapia curativa estándar. Sin embargo, la disponibilidad de donante es inferior al 20%. Los TPH-DnE todavía conllevan riesgos elevados de enfermedad de injerto contra receptor (EICR), inaceptables hoy en día. Los TPH haploidénticos con depleción de células T, que naturalmente aumentan la posibilidad de disponer de un donante en más de un 80% con bajas tasas de EICR, han mostrado buenos resultados en comunicaciones recientes, gracias a modificaciones en los regímenes de acondicionamiento y profilaxis de la EICR, sobre todo en pacientes trasplantados en edades comprendidas entre los 3 y los 20 años. Paradójicamente, a pesar de los buenos resultados en el TPH, todavía se carece de índices precisos que ayuden a decidirse por esta alternativa de tratamiento. La recomendación general es trasplantar a los pacientes con ACF en edad joven y evitar el TPH durante la edad adulta.

En cuanto a la terapia génica, es una opción atractiva que podría superar las complicaciones que supone un TPH alogénico convencional. Se utilizan vectores lentivirales para transfectar a los progenitores hematopoyéticos con el gen que codifica la cadena beta de la globina corregido, al igual que en los casos de betatalasemia. Una vez realizada la inoculación de las células CD34+, se procede a realizar un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos. Actualmente, esta terapia se encuentra en ensayo clínico fases 2 y 3, con excelentes resultados y sin complicaciones graves derivadas por los lentivirus tras al menos 3 años de seguimiento.

Una variante de la terapia génica es la edición génica, que se basa en lograr modificaciones precisas en el ADN de los progenitores hematopoyéticos *ex vivo* sin necesidad de vectores virales, con la ventaja por tanto de dirigirse al gen de interés y sin la posible toxicidad del vector. En la actualidad, hay diferentes tecnologías en aplicación a modelos animales: ZFN (*zinc-finger nucleases*), TALEN (*transcription activator-like effector nucleases*) y CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*). Esta última

es más económica, rápida y eficiente, y los resultados preliminares son alentadores.

Otro grupo dentro de los tratamientos primarios son los inductores de la HbF y agentes antifalciformación. La HU lleva mas de 20 años demostrando su eficacia en adultos y en 2017 fue aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) para ser utilizada en niños mayores de 2 años. Su efecto terapéutico es múltiple, aunque el principal es el de elevar la concentración de HbF, por lo que también actúa como agente antifalciformación. Trabajos recientes indican que el inicio de la HU alrededor del año de vida o antes, con una estrategia de dosificación personalizada, puede proporcionar mejores beneficios clínicos. No se ha observado retraso en el desarrollo de niños en tratamiento con HU ni tampoco parece incrementar la carcinogénesis, aunque se debe seguir observando. Se desconoce el efecto que puede tener sobre la fertilidad en los niños tratados cuando alcancen la edad adulta.

Otros fármacos que se están estudiando actualmente como inductores de la HbF son la decitabina, la pomalidomida, el panobinostat o la metformina, aunque aún se encuentran en fases precoces.

Los agentes antifalciformación evitan la polimerización por mecanismos diferentes al aumento de la HbF. En este grupo están: 1) aquellos que previenen la deshidratación eritrocitaria (senicapoc y magnesio); 2) los que retardan la salida del CO_2 de los eritrocitos con uso de carboxihemoglobina pegilada (Sanguinate®); y 3) los que incrementan la afinidad por el oxígeno generando un retraso en la generación de desoxi-HbS (voxelotor, actualmente en ensayo clínico fase 3).

› *Tratamientos secundarios*

Son aquellos que intentan paliar los efectos de la falciformación. Entre ellos, tenemos:

• **Antioxidantes**: a destacar la L-glutamina, N-acetilcisteína y la L-arginina, entre otros. La L-glutamina ha sido aprobada por la FDA en 2018 para la prevención de crisis vasooclusivas (CVO) en adultos y niños mayores de 4 años. El estudio pivotal demostró que, en pacientes con ACF, la L-glutamina a 0,3 g/kg/2 veces al día *versus* placebo disminuía la tasa de incidencias de CVO durante 48 semanas de seguimiento. Su efecto se basa en que puede incrementar el potencial redox del NAD y los niveles de NADH en los hematíes falciformes reduciendo los radicales libres. El fármaco parece ser razonablemente bien tolerado a corto plazo, aunque no hay datos publicados sobre su uso a largo plazo.

La N-acetilcisteína, además de su potencial antioxidante, tiene efectos sobre los multímeros del factor de von Willebrand. Es bien tolerado tanto por vía oral como intravenosa, aunque parece que el empleo parenteral, al lograr mayores concentraciones, presenta mejores resultados.

L-arginina es el sustrato obligado para la producción de óxido nítrico (NO). En pacientes con ACF el desequilibrio metabólico del NO induce daño endotelial. En ensayos clínicos fase 2 se ha comunicado que el uso de L-arginina reduce el consumo de opiáceos durante las CVO y disminuye su incidencia.

• **Inhibidores de la adhesión**. Entre ellos, se encuentran diferentes fármacos en fase experimental. El más avanzado es el crizanlizumab, actualmente en fase 3. Es un anticuerpo monoclonal anti P-selectina (molécula de adherencia celular presente en hematíes, células endoteliales, leucocitos y plaquetas activadas). En el estudio *SUSTAIN* (fase 2) se demostró que, a dosis de 5 mg/kg, administrado por vía intravenosa cada 4 semanas, reducía la incidencia de CVO en comparación con placebo (1,63 *vs*. 2,98) durante un seguimiento de 52 semanas.

El rivipansel es un antagonista panselectina con preferencia sobre la E-selectina de administración intravenosa, cuyos resultados en el ensayo clínico de fase 2 fueron satisfactorios y actualmente se encuentra en fase 3.

Se ha comunicado un nuevo derivado de heparina de bajo peso molecular sulfatada sin capacidad anticoagulante para uso subcutáneo y oral, con una amplia actividad antiselectina y antiinflamatoria, y que puede ser de interés en un futuro. Actualmente está en ensayo de fase 2 la sevuparina, que es una heparina modificada sin efecto anticoagulante que retiene la propiedad de unirse a la selectina P.

Otros fármacos como propranolol e inmunoglobulinas intravenosas también se encuentran en estudio para valorar su capacidad antiadhesión.

• **Terapias antitrombóticas y antiinflamatorias**. La ACF genera, por múltiples mecanismos, un estado crónico inflamatorio y procoagulante con incremento del riesgo trombótico sobradamente demostrado, con una elevada incidencia de enfermedad tromboembólica venosa y alta recurrencia. Por ello, es-

tán activos diversos ensayos clínicos con fármacos antitrombóticos y antiinflamatorios, aunque algunos como prasugrel y regadenoson no han demostrado efectividad.

Las estatinas previenen el daño endotelial incrementando la síntesis de NO. Con la simvastatina se ha observado (datos preliminares) una reducción en las tasas de dolor y de los marcadores de la inflamación, que fue mayor en aquellos que estaban en tratamiento con HU, lo que sugiere un efecto sinérgico con ella. Estos efectos no se han observado con atorvastatina.

› Conclusiones

En los últimos años se ha realizado un enorme avance en las alternativas de tratamiento para pacientes afectos de formas graves de talasemia y anemia falciforme, gracias al mayor conocimiento de la fisiopatología que ha permitido dirigir nuevas dianas terapéuticas.

Con la disponibilidad de más fármacos, comienza a considerarse la posibilidad de su uso conjunto, buscando un efecto sinérgico con riesgos asumibles.

El TPH se ha consolidado como la terapia curativa estándar y, dados los buenos resultados de los trasplantes de DnE y haploidénticos, se abre una oportunidad para aquellos pacientes que no disponen de donante familiar. Asimismo, en un futuro, podremos contar con la terapia génica, la cual se encuentra en una fase avanzada de desarrollo.

› Bibliografía

- Angelucci E. Hematopoietic Cell Transplantation in Thalassemia and Sickle Cell Disease: Report from the European Society of Blood and Bone Marrow transplantation. Hemoglobinopathy registry: 2000-2017. 168 Oral Abstract, 60th ASH Annual Meeting and exposition, 2018.
- Kapoor S, Little JA, Pecker LH. Advances in the treatment of Sickle Cell Disease. Mayo Clin Proc. 2018 Dec;93(12):1810-24.
- Moerdler S, Manwani D. New insights into the pathophysiology and development of novel therapies for sickle cell disease. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2018 Nov 30;2018(1):493-506.
- Porter J. Beyond transfusion therapy: new therapies in thalassemia including drugs, alternate donor transplant, and gene therapy. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2018 Nov 30;2018(1):361-70.
- Telen MJ. Beyond hydroxyurea: new and old drugs in the pipeline for sickle cell disease. Blood. 2016;127(7):810-9.
- Torres L, Conran N. Emerging pharmacotherapeutic approaches for the management of sickle cell disease. Expert Opin Pharmacother. 2019 Feb;20(2):173-86.

Tratamiento de la púrpura trombótica trombocitopénica: nuevas estrategias

F. Ataúlfo González Fernández
Hospital Clínico San Carlos, Madrid

La púrpura trombótica trombocitopénica (PTT) es un tipo particular de microangiopatía trombótica (MAT) caracterizada por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y afectación isquémica multiorgánica con una alta mortalidad, mayor del 90%, sin tratamiento. Tras la introducción de los recambios plasmáticos (RP) como tratamiento de primera línea a principios de los noventa, la mortalidad se ha reducido al 10-15%, ocurriendo la mayoría de los *exitus* por episodios isquémicos durante las primeras 24-48 horas del inicio de la MAT. Más de un tercio de los supervivientes presentan una o más recaídas y una parte considerable de los supervivientes ve afectada su calidad de vida, con depresión, trastornos de ansiedad y déficits neurocognitivos[1].

› Bases fisiopatológicas del tratamiento

La PTT es producida por un fallo a la hora de degradar los multímeros ultralargos del factor de von Willebrand (FvW-UL) por un déficit funcional de una enzima llamada ADAMTS13 (acrónimo de *A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin-1 motifs; 13th member of the family*). Esta deficiencia de actividad de ADAMTS13 en más del 95% de los casos es debida a la existencia de autoanticuerpos anti-ADAMTS13 (PTT adquirida o inmune) y en menos de 5% es producida por mutaciones genéticas (PTT congénita, de herencia autosómica recesiva)[2].

El FvW es sintetizado en los megacariocitos y en las células endoteliales, almacenándose como multímeros FvW-UL, siendo estos multímeros de alto peso molecular más activos hemostáticamente. Los multímeros FvW-UL son liberados cuando existe una lesión endotelial o ante estímulos como trombina, histamina, vasopresina y citocinas inflamatorias, anclándose a las células endoteliales para favorecer la agregación y la adhesión de las plaquetas en las zonas de lesión endotelial a través de su unión con las glicoproteínas de membrana de las plaquetas. En la circulación presentan una configuración plegada o compacta que evita que se expongan las zonas de unión a las plaquetas evitando la agregación espontánea de estas últimas. En la microcirculación (arteriolas y capilares) las condiciones de flujo de cizallamiento hacen que cambien su configuración desplegando estas zonas de interacción con las glicoproteínas de membrana plaquetarias y con las fibras de colágeno de lámina basal subendotelial, favoreciendo la adhesión y agregación de las plaquetas cuando existe una lesión endotelial.

Por tanto, en la microcirculación se crea un cierto estado protrombótico que es regulado por la actividad enzimática de ADAMTS13 que rompe los multímeros FvW-UL por proteólisis. La ausencia de la actividad enzimática de ADAMTS13 determinaría una acumulación de los multímeros FvW-UL en el endotelio y en la circulación, con una eventual formación de microtrombos ricos en plaquetas y FvW que serían responsables de la isquemia con daño tisular que puede afectar a diferentes órganos (sistema nervioso central –SNC–, riñón, tubo digestivo, corazón, páncreas, glándulas suprarrenales e hígado), trombocitopenia por consumo y hemólisis por fragmentación de los hematíes[2].

La base del tratamiento actual consiste en suministrar ADAMTS13 a través de la administración de grandes volúmenes de plasma, en asociación con plasmaféresis para prevenir sobrecarga de fluidos y posiblemente eliminar autoanticuerpos anti-ADAMTS13 y los multímeros FvW-UL[3].

La identificación del papel central de los anticuerpos anti-ADAMTS13 en la fisiopatología de la PTT adquirida, que ahora se considera una enfermedad autoinmune, ha llevado a tratamientos inmunosupresores más intensos que el tratamiento habitual con esteroides. En este contexto, la introducción de rituximab probablemente ha sido el segundo gran avance en

el manejo de la PTT. Sin embargo, dada la rareza de la PTT y la dificultad resultante para realizar grandes ensayos prospectivos, el conocimiento actual sobre el uso de rituximab en esta enfermedad se basa en pocos estudios con un número limitado de pacientes y niveles moderados de evidencia. Además, estos estudios plantearon muchas preguntas que permanecen sin resolver. ¿Se debe usar el rituximab como tratamiento de primera línea o solo en pacientes con una respuesta subóptima al RP? ¿Cuál es el programa óptimo de administración de rituximab? ¿Se debe usar el rituximab sistemáticamente como terapia preventiva? ¿Qué estrategia se debe usar cuando el rituximab no mejora la actividad de ADAMTS13?[3,4].

Dado que la interacción de los multímeros FvW-UL con las glicoproteínas de membrana de las plaquetas es la responsable de la formación de microtrombos que determinan la isquemia con daño tisular, se han desarrollado nuevas estrategias que tienen como diana terapéutica esta interacción. Recientemente se ha aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) y la European Medicines Agency (EMA) un nanoanticuerpo bivalente humanizado (caplacizumab) que evita la aglutinación de las plaquetas en la microvasculatura al bloquear la interacción del FvW con el receptor plaquetario GPIb-IX-V[3,5].

› Diagnóstico diferencial entre microangiopatías trombóticas

Existe un solapamiento de las manifestaciones clínicas entre la PTT y el resto de los diferentes tipos de MAT, por lo que en la actualidad se admite que los signos y síntomas clínicos no son específicos ni dependen de la causa de la MAT, y que por lo tanto no permiten efectuar un diagnóstico diferencial preciso entre estas entidades.

Actualmente, se considera que para confirmar el diagnóstico de PTT debe existir una actividad de ADAMTS13 < 10%. El resto de las MAT suelen presentar actividades superiores al 20%, lo que descarta la PTT. Excepcionalmente, un pequeño porcentaje de casos de MAT puede presentar actividades entre el 10 y el 20%, cuya interpretación podría resultar algo ambigua. En estas situaciones es útil verificar la presencia de inhibidor y anticuerpos anti-ADAMTS13, ya que estos pacientes con actividades detectables pero con inhibidor también podrían beneficiarse del tratamiento de la PTT adquirida[6]. No siempre es posible tener los resultados de la actividad de ADAMTS13 tan rápido como desearíamos. Motivado por la alta morbimortalidad temprana de la PTT, se han desarrollado algunos modelos que combinan determinadas características clínicas en un intento de predecir o diferenciar a los pacientes con déficit severo de ADAMTS13 o sin él[7-9]. Estos modelos no tienen como objetivo redefinir los criterios de diagnóstico de la PTT, que se basan en la deficiencia severa de ADAMTS13; sin embargo, es posible que identifiquen rápidamente a los pacientes que tienen más probabilidades de tener una PTT y, por tanto, se beneficien de un tratamiento de emergencia.

› Estado actual del tratamiento

El tratamiento de la PTT constituye una emergencia hematológica debido a su alta morbilidad y mortalidad. Por tanto, ante el diagnóstico de una MAT se debe considerar a la PTT como la primera entidad posible antes de haber concluido el diagnóstico diferencial del tipo de MAT y se debe iniciar el tratamiento de forma inmediata, preferiblemente en las primeras 4-8 horas desde el diagnóstico[10].

En el caso de la PTT, esta última alcanza hasta el 90% de los casos sin tratamiento y cerca de la mitad de las muertes se producen en las primeras 24 horas desde la presentación. La edad avanzada y un nivel de LDH muy alto (reflejo de la hemólisis y del daño orgánico) se han relacionado con una mayor mortalidad. Un nivel elevado de troponina sérica en el momento del diagnóstico es un evento común (observado hasta en el 60% de los pacientes) y constituye un factor pronóstico adverso independiente de muerte y refractariedad al tratamiento. Su determinación, por tanto, debe incorporarse en la evaluación inicial para identificar pacientes más graves[3].

› *Recambio plasmático*

El RP mediante plasmaféresis constituye el pilar principal del tratamiento. Aunque algunos aspectos relacionados con el esquema terapéutico aún no están totalmente establecidos, se recomienda realizar el recambio de 1-1,5 volemias/día, lo que supone el aporte de 40-60 mL/kg de plasma. Con volúmenes plasmáticos por debajo de 1 la eficacia del RP es menor y por encima de 2 volúmenes plasmáticos los efectos

adversos se incrementan. No obstante, en los casos refractarios o con riesgo vital se puede incrementar a 2 volemias plasmáticas o realizar un RP cada 12 h.

Como solución de reposición se ha usado plasma fresco congelado (PFC) no modificado, sobrenadante de crioprecipitado o plasma inactivado por diversos métodos (solvente detergente, azul de metileno, amotosaleno). Aunque se han descrito niveles de actividad de ADAMTS13 ligeramente superiores en el plasma no modificado y en el sobrenadante de crioprecipitado, prácticamente en todas las soluciones de reposición el nivel es similar, sin que ninguna de ellas sea claramente superior. Con el plasma inactivado con azul de metileno, en diferentes estudios publicados se ha descrito un mayor número de RP para alcanzar la remisión y un aumento del consumo de plasma. En algunas ocasiones se ha usado albúmina al 5% durante la primera mitad del procedimiento y plasma en el resto.

Los RP se deben realizar diariamente hasta alcanzar una respuesta clínica, definida por un recuento de plaquetas superior a 150 × 10^9/L, una LDH inferior a 1,5 veces el nivel superior de la normalidad y estabilidad o mejoría del daño orgánico durante al menos 2 días consecutivos. Una vez alcanzada esta respuesta, la reducción progresiva en la frecuencia de los RP o la disminución del volumen del recambio no ha demostrado que reduzca el riesgo de recaídas respecto a la interrupción brusca del RP.

Las complicaciones del RP están fundamentalmente relacionadas con el acceso vascular para el procedimiento (sepsis, hemorragia o trombosis del catéter), aunque también se han descrito otras complicaciones como reacciones alérgicas, hipotensión y arritmias con asistolia. Se han comunicado hasta un 24% de complicaciones, algunas con desenlace fatal, aunque en las series más recientes este porcentaje ha descendido significativamente.

El RP ha demostrado que es más eficaz que la infusión de plasma con un grado de respuesta del 78 *vs*. 49%. No obstante, en las situaciones en que no se pueda realizar un RP de forma inmediata, la infusión de plasma a altas dosis de 25-30 mL/kg como terapia puente estaría indicada con monitorización de la sobrecarga de volumen[10-12].

› *Corticoides*

El uso de corticoides como tratamiento inmunosupresor en la PTT está recomendado por la mayoría de los autores. No obstante, no hay ningún estudio que haya demostrado que la asociación de corticoides al RP sea superior al RP sin su asociación. Sin embargo, en un estudio que comparaba los corticoides frente a RP más corticoides, más de la mitad de los pacientes que recibieron únicamente tratamiento con corticoides alcanzaron la remisión, aunque dichos pacientes mostraban formas leves de la enfermedad.

La dosis habitual recomendada es de 1 mg/kg/día de prednisona o prednisolona. En un estudio comparativo aleatorizado se observó que con dosis mayores de metilprednisolona 10 mg/kg/día durante 3 días y posteriormente 2,5 mg/kg/día, a los 23 días de tratamiento se obtenían mayores tasas de respuesta (46,6 frente al 32%), por lo que esta pauta se debería tener en cuenta en pacientes especialmente críticos con manifestaciones severas de la enfermedad, refractarios o en recaída[10-12].

› *Rituximab*

El rituximab ha sido utilizado en PTT adquirida refractaria al tratamiento, definiendo esta como la persistencia de la trombopenia, la ausencia de un aumento mantenido de plaquetas o una cifra de plaquetas menor de 50 × 10^9/L y un aumento de la LDH más de 1,5 veces el límite superior a la normalidad después de 5 RP más tratamiento con corticoides. Las tasas de repuestas se sitúan entre el 87 y el 100% de las series publicadas con una mediana entre 11 y 14 días en la recuperación de las plaquetas desde la infusión de la primera dosis.

La dosis utilizada es la habitual en los síndromes linfoproliferativos, 375 mg/m^2 una vez a la semana por 4 semanas. También se ha utilizado la misma dosis los días 0, 3, 7 y 14, y dosis menores de 100 mg/m^2 una vez por semana asociadas a RP y corticoides. El 65% del rituximab es eliminado por el RP, por lo que se debe infundir después de haber finalizado el recambio y esperar un mínimo de 18 horas para realizar el siguiente RP si es posible.

Recientemente, se han publicado trabajos que valoran el empleo de rituximab en etapas iniciales de la enfermedad. En estos el uso de rituximab en los 3 primeros días desde el diagnóstico se asocia a una respuesta más precoz con una necesidad de menor número RP, una hospitalización más corta y una menor tasa de recidivas respecto a sus controles históricos. No se han observado recidivas durante el primer año

en los pacientes respondedores, aunque sí se pueden dar recaídas tardías.

En las guías clínicas británicas se recomienda su uso precoz junto con RP y corticoides en aquellos pacientes con alto riesgo de mortalidad (afectación neurológica y/o cardiaca); sin embargo, el rituximab no ha logrado prevenir la mortalidad temprana en los primeros 10 días[10-12].

› *Caplacizumab*

El caplacizumab es un nanoanticuerpo bivalente humanizado producido por *E. coli* que actúa bloqueando la interacción del receptor plaquetario GPIb-IX-V con el FvW, al que se une mediante el dominio A1. De esta forma, evita la agregación de las plaquetas en la microvasculatura, la trombocitopenia y la isquemia tisular.

Su eficacia se ha demostrado en 2 estudios, fase II (*TITAN*) y fase III (*HERCULES*), multicéntricos, aleatorizados, controlados con placebo. En ambos estudios, la adición de caplacizumab al tratamiento convencional (RP y corticoides con o sin rituximab) disminuyó significativamente el tiempo de recuperación del recuento de plaquetas y de los biomarcadores que reflejan daño orgánico isquémico. También se redujo el número de RP, de días en la unidad de cuidados intensivos y de hospitalización, y la incidencia de exacerbaciones en los primeros 30 días tras conseguir la respuesta al tratamiento. Sin embargo, como su mecanismo de acción no va dirigido a la respuesta inmune, se observó un mayor número de recaídas tras la suspensión del tratamiento en los pacientes con persistencia del déficit severo de ADAMTS13. Por tanto, el caplacizumab constituye un tratamiento puente que controla la enfermedad hasta que exista una respuesta del tratamiento inmunosupresor con la normalización de la actividad de ADAMTS13. Esta actividad se debería monitorizar semanalmente después de recuperar las plaquetas y no retirar el caplacizumab mientras persista bajo hasta su normalización. Caplacizumab también se asoció en estos estudios con una menor tasa de muertes relacionadas con la PTT y de complicaciones tromboembólicas mayores, con un aumento de manifestaciones hemorrágicas menores, sin que se describieran casos de hemorragias mayores o fatales.

Aunque el caplacizumab puede mejorar la supervivencia de los pacientes con PTT en la fase temprana de la enfermedad hasta la mejoría de la actividad de ADAMTS13 con el tratamiento inmunosupresor, que por lo general ocurre dentro de los 30 días, quedan preguntas por resolver como el tiempo óptimo de la duración del tratamiento, su impacto en la supervivencia y su seguridad fuera de ensayos controlados[5,13].

› *Antiagregantes*

El uso de antiagregantes junto a RP y corticoides no ha demostrado una mejoría en el grado de respuesta ni en la reducción de la mortalidad temprana. Se ha descrito un incremento de hemorragias asociadas a su uso, por lo que solo se deben administrar si el recuento de plaquetas es > 50 × 10^9/L[10,12].

› *Esplenectomía*

La esplenectomía se ha utilizado en casos refractarios y para prevenir las sucesivas recaídas con resultados dispares. Se ha comunicado un porcentaje libre de recaídas a los 10 años del 70% y una mortalidad cercana al 40% en pacientes refractarios o con recaídas. En el momento actual se considera que su balance beneficio/riesgo es claramente inferior al tratamiento inmunosupresor, por lo que solo se debe considerar en casos muy seleccionados[14].

› *Otros inmunosupresores*

Se han utilizado diversos agentes inmunodepresores como la ciclosporina, la vincristina, la azatioprina o la ciclofosfamida junto al RP y corticoides, fundamentalmente en pacientes refractarios o recaídas, en series cortas de pacientes con buenos resultados en algunos casos. No obstante, los resultados son inferiores al rituximab, con una toxicidad potencial mayor, por lo que su uso se debe considerar solo en casos refractarios a rituximab[14].

› *Bortezomib*

El bortezomib es un inhibidor del proteasoma que ha demostrado una alta actividad antitumoral frente a las células plasmáticas en mieloma múltiple. Se han comunicado algunos casos con buenos resultados en pacientes con PTT refractarios a RP, corticoides y rituximab, observándose en estos casos una depleción

de los autoanticuerpos anti-ADAMTS13. No obstante, dado el escaso número de pacientes reportado y que también se han comunicado algunos casos de MAT asociados al bortezomib en mieloma múltiple, es necesario que se realicen estudios controlados para confirmar su utilidad[14].

› *Transfusión de plaquetas*

La transfusión de plaquetas profiláctica en los pacientes con PTT no se considera indicada e incluso podría contribuir al mantenimiento del mecanismo fisiopatológico de la MAT. No obstante, pese a que se han descrito algunos casos de empeoramiento del cuadro clínico con la transfusión de plaquetas, en la mayoría de los estudios no ha sido confirmado su posible impacto negativo, por lo que se debe considerar en situaciones de hemorragias graves o para prevenir la pérdida de sangre antes de maniobras diagnósticas o terapéuticas con riesgo hemorrágico[12].

› *ADAMTS13 recombinante*

Estudios *in vitro* y en modelos murinos de experimentación han demostrado la posible utilidad del ADAMTS13 recombinante en el tratamiento tanto de la PTT adquirida como congénita. El problema potencial de que los anticuerpos anti-ADAMTS13 bloquearían y/o acelerarían el aclaramiento de la proteína recombinante se podría resolver utilizando grandes dosis o proteínas mutantes que perdieran su capacidad antigénica y mantuvieran su actividad enzimática. En este sentido, en el momento actual se están completando estudios en fase I y están programados estudios en fase II para la PTT adquirida, y en fase III para la PTT congénita[14].

› *N-acetilcisteína*

La N-acetilcisteína es un fármaco usado en el tratamiento de la sobredosis del acetaminofeno o para disminuir la viscosidad de las secreciones mucosas en los trastornos respiratorios, ya que reduce los enlaces disulfuro en los polímeros de mucina disminuyendo el tamaño y la viscosidad de las mucinas. Partiendo de la similitud estructural entre el FvW y la mucina, su uso se ha propuesto en la PTT como posible sustituto de ADAMTS13 en la reducción de los puentes disulfuros de los multímeros del FvW. Se ha utilizado en un escaso número de pacientes con resultados dispares. En la actualidad se está realizando un estudio piloto para valorar su posible utilidad[14].

› Monitorización del tratamiento

En torno a un 30-40% de los pacientes presentan una o más recidivas de la enfermedad una vez superado el episodio agudo, con un riesgo de complicaciones y muerte en cada episodio. La persistencia o la aparición de un déficit severo de ADAMTS13 (actividad < 10-20%) se asocia a un riesgo aumentado de recaída con una incidencia acumulada a los 7 años del 74%, mientras que el significado de la persistencia o aparición de anticuerpos anti-ADAMTS13 por sí solos es controvertido.

El tratamiento preventivo con una sola dosis de rituximab, en estos casos de déficit severo en remisión clínica, disminuye la aparición de recurrencias de episodios agudos y en más del 80% de los casos la actividad de ADAMTS13 aumenta por encima del 20% en un periodo de 4-6 semanas. Sin embargo, hasta en un 50% de los casos, esta recuperación de los niveles de ADAMTS13 es transitoria y vuelven a descender característicamente pasado un año del retratamiento con rituximab. Consecuentemente, en estos casos son necesarias infusiones adicionales de rituximab para volver a recuperar los niveles de ADAMTS13 y prevenir las recaídas clínicas[3].

Por tanto, aunque no existe un claro consenso, algunos autores recomiendan la monitorización de la actividad de ADAMTS13 cada 3 meses durante los 3 primeros años, luego 2 veces al año durante 2 años y posteriormente de forma anual si los niveles permanecen estables[3]. No obstante, hasta un tercio de los pacientes no va a presentar una recaída clínica pese a presentar niveles de actividad < 10%, por lo que con una estrategia de tratamiento preventivo se sobretratarían algunos pacientes con rituximab, que no está exento de riesgos, sobre todo infecciosos.

› Púrpura trombótica trombocitopénica congénita

En la PTT congénita, el tratamiento actual, hasta que no se disponga de ADAMTS13 recombinante, consiste

en la infusión de plasma. Se puede utilizar PFC a una dosis de 10-15 mL/kg o concentrados de factor VIII de pureza intermedia, donde se ha demostrado la existencia de actividad de ADAMTS13. La frecuencia y la dosificación varían según el fenotipo del paciente. Algunos requieren terapia "profiláctica" regular para mantener el recuento de plaquetas normal y evitar recaídas ante infecciones y otras situaciones de estrés, mientras que otros con fenotipos leves solo requieren tratamiento ocasional[10].

› Consideraciones finales

• Un rápido diagnóstico y un tratamiento precoz están claramente relacionados con un resultado favorable, debido a su alta morbimortalidad precoz.

• La refractariedad al tratamiento junto al retraso en el inicio del tratamiento constituyen los principales factores relacionados con la mortalidad, por lo que la introducción precoz del tratamiento concomitante de rituximab y caplacizumab podría disminuir el tiempo de recuperación del daño orgánico y prevenir las exacerbaciones, al acortar el tiempo en la recuperación de la actividad del ADAMTS13 y evitar la agregación de las plaquetas en la microvasculatura hasta la normalización de esta actividad.

• El tratamiento preventivo durante el seguimiento de los pacientes con déficit severo de la actividad ADAMTS13 en remisión clínica disminuye las recaídas de la enfermedad y, por tanto, el riesgo de complicaciones y muerte de cada recaída. No obstante, con esta estrategia se sobretratarían algunos pacientes que no tendrían una recaída clínica pese a mantener niveles bajos de actividad de ADAMTS13.

• El desarrollo de terapias dirigidas a la fisiopatología de la enfermedad como el caplacizumab y el rituximab está cambiando el panorama del manejo terapéutico de la enfermedad y constituye un ejemplo del éxito de la medicina traslacional. En este sentido, la posible introducción del ADAMTS13 recombinante en el tratamiento como sustituto de los RP podría constituir en un futuro, junto al caplacizumab y el rituximab, la tríada estándar del tratamiento de la PTT adquirida.

› Bibliografía

1. Joly BS, Coppo P, Veyradier A. Thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood. 2017 May 25;129(21):2836-46.
2. Turner NA, Nolasco L, Ruggeri ZM, Moake JL. Endothelial cell ADAMTS-13 and VWF: production, release, and VWF string cleavage. Blood. 2009 Dec 3;114(24):5102-11.
3. Coppo P, Cuker A, George JN. Thrombotic thrombocytopenic purpura: toward targeted therapy and precision medicine. Res Pract Thromb Haemost. 2018 Nov 16;3(1):26-37.
4. Coppo P; French Reference Center for Thrombotic Microangiopathies. Management of thrombotic thrombocytopenic purpura. Transfus Clin Biol. 2017 Sep;24(3):148-53.
5. Peyvandi F, Scully M, Kremer Hovinga JA, Cataland S, Knöbl P, Wu H, et al. Caplacizumab for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. N Engl J Med. 2016 Feb 11;374(6):511-22.
6. Sadler JE. What's new in the diagnosis and pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2015;2015:631-6.
7. Coppo P, Schwarzinger M, Buffet M, Wynckel A, Clabault K, Presne C, et al.; French Reference Center for Thrombotic Microangiopathies. Predictive features of severe acquired ADAMTS13 deficiency in idiopathic thrombotic microangiopathies: the French TMA reference center experience. PLoS One. 2010 Apr 23;5(4):e10208.
8. Bendapudi PK, Hurwitz S, Fry A, Marques MB, Waldo SW, Li A, et al. Derivation and external validation of the PLASMIC score for rapid assessment of adults with thrombotic microangiopathies: a cohort study. Lancet Haematol. 2017 Apr;4(4):e157-e164.
9. Nieto JM, De La Fuente-Gonzalo F, González FA, Villegas A, Martínez R, Fuentes ME, Ropero P. Development and validation of a multivariable prediction rule for detecting a severe acquired ADAMTS13 activity deficiency in patients with thrombotic microangiopathies. Clin Chem Lab Med. 2018 Jan 26;56(2):294-302.
10. Scully M, Goodship T. How I treat thrombotic thrombocytopenic purpura and atypical haemolytic uraemic syndrome. Br J Haematol. 2014 Mar;164(6):759-66.
11. Contreras E, de la Rubia J, Del Río-Garma J, Díaz-Ricart M, García-Gala JM, Lozano M; Grupo Español de Aféresis. Diagnostic and therapeutic guidelines of thrombotic microangiopathies of the Spanish Apheresis Group. Med Clin (Barc). 2015 Apr 8;144(7):331.
12. George JN. How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura: 2010. Blood. 2010;116(20):4060-9.
13. Scully M, Cataland SR, Peyvandi F, Coppo P, Knöbl P, Kremer Hovinga JA, et al. Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. N Engl J Med. 2019 Jan 24;380(4):335-46.
14. Sayani FA, Abrams CS. How I treat refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood. 2015;125(25):3860-7.

Avances en la enfermedad por aglutininas frías

Montserrat López Rubio, Isabel Gutiérrez Jomarrón
Servicio de Hematología, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid

› Introducción

Las anemias hemolíticas autoinmunes (AHAI) son un grupo de enfermedades caracterizadas por hemólisis debida a autoanticuerpos dirigidos contra antígenos de la superficie de los hematíes, con o sin activación del complemento. Se clasifican según la temperatura de reactividad de los anticuerpos y por la presencia o ausencia de enfermedad asociada (Tabla 1). La incidencia es de 0,8-3/10^5 habitantes/año, siendo más prevalentes en adultos y en mujeres. El 80% de las AHAI corresponden a anticuerpos calientes IgG o IgG+C (complemento) y el 13-15% a anticuerpos fríos IgM con Coombs directo (CD) positivo a C3d. Existe un pequeño porcentaje de AHAI de mecanismo mixto y AHAI atípicas donde el anticuerpo implicado es IgA, IgM caliente o el CD es negativo, siendo menos del 5% del total. Las AHAI secundarias se asocian a procesos linfoproliferativos, enfermedades autoinmunes, infecciones o fármacos, mientras que se consideran primarias si no se encuentra la causa[1]. Las AHAI frías se clasifican como CAD (*cold agglutinin disease*) cuando son primarias, siendo consideradas como un trastorno linfoproliferativo de bajo grado, y CAS (*cold agglutinin syndrome*) si son secundarias[2].

Tabla 1. Clasificación de las anemias hemolíticas autoinmunes

Anticuerpos calientes
• Primarias
• Secundarias – Síndromes linfoproliferativos – Conectivopatías: lupus eritematoso sistémico (LES), dermatomiositis, esclerodermia… – Enfermedades diversas - Componente inmune: anemia perniciosa, púrpura trombocitopénica inmune (PTI), colitis ulcerosa… - Tumores: quiste dermoide de ovario, teratoma
Anticuerpos fríos
• Enfermedad por aglutininas frías primaria crónica (CAD)
• Síndrome de aglutininas frías secundaria (CAS) – Asociado con enfermedad maligna – Asociado a infección
• Hemoglobinuria paroxística *a frigore* (HPF)
Mixta, por anticuerpos calientes y fríos
Atípicas

› Patogenicidad de las aglutininas frías

Las crioaglutininas (CA) son anticuerpos definidos por su capacidad para aglutinar hematíes a una temperatura óptima de 0-4 °C. La mayoría de las CA son de clase IgM, pero pueden encontrarse IgG o IgA de manera ocasional. Las CA pueden determinarse de manera semicuantitativa, mediante titulación, basada en su capacidad para aglutinar hematíes a 4 °C. La amplitud térmica se define como la temperatura más alta a la cual la CA reacciona con el antígeno. En general, la patogenicidad de la CA es más dependiente de la amplitud térmica que del título. Si la amplitud térmica excede los 28-30 °C, los hematíes aglutinan en las partes acras del cuerpo, fijando complemento responsable de la hemólisis.

La CA se dirige la mayoría de las veces contra el sistema de grupo sanguíneo I/i, siendo más patogénicas las de especificidad anti-I, que es el antígeno que predomina en individuos mayores de 18 meses. Ocasionalmente, la CA puede presentar especificidad contra el antígeno Pr, siendo altamente patogénicos.

El mecanismo por el que la CA produce la hemólisis es representado en la Figura 1. El enfriamiento de la sangre en las partes acras de la circulación provoca la unión de la CA a los hematíes, causando la aglutinación y la unión de la fracción C1 del complemento que activa la vía clásica del complemento generando C3b. Cuando la sangre retorna a las zonas centrales

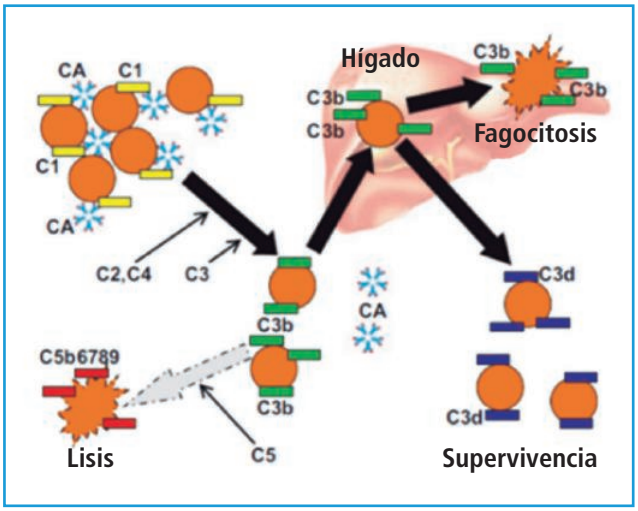


Figura 1. Patogenia de las anemias hemolíticas autoinmunes (AHAI) por anticuerpos fríos. Hemólisis mediada por complemento en la enfermedad por crioaglutininas (CA). La hemólisis intravascular predomina en situaciones de hemólisis aguda, mientras que en la hemólisis crónica es extravascular, fundamentalmente hepática. Berentsen S, Sundic T. Biomed Res Int. 2015;2015:363278.

del cuerpo, con una temperatura de 37 °C, la CA se separa de la membrana del hematíe, mientras que C3b se mantiene unido. Una parte de los hematíes unidos a C3b son secuestrados por el sistema reticuloendotelial, principalmente en el hígado. En la superficie de los hematíes supervivientes, el C3b es fragmentado, produciendo C3d en la superficie del hematíe. La activación del complemento puede provocar la activación de C5 y posterior formación del complejo de ataque a la membrana, provocando hemólisis intravascular, pero las proteínas de superficie CD55 y CD59 impiden en gran medida la activación de la vía terminal del complemento. Por tanto, el principal mecanismo de hemólisis es la destrucción extravascular.

Estos mecanismos explican el test de Coombs positivo a C3d y negativo para IgM e IgG. En un 20% de los pacientes con enfermedad por CA primaria, el test de Coombs es débilmente positivo para IgG, lo cual no significa que sea una AHAI de tipo mixto.

› Enfermedad por crioaglutininas crónica primaria

La enfermedad por CA crónica primaria (CAD) tiene una prevalencia en Noruega de 16 × 10^6 habitantes y una incidencia de 1 × 10^6 habitantes/año. La mediana de edad es de 76 años y la mediana de comienzo de los síntomas de 67 años[3,4].

Se considera un síndrome linfoproliferativo (SLP) B monoclonal IgM kappa, demostrable en el 90% de los casos por citometría de flujo y en el 76% por inmunohistoquímica, en médula ósea. La morfología es similar al linfoma linfoplasmocítico, pero es MYD88 negativo[5], con uso selectivo del segmento génico IGHV4-34 y reordenamiento clonal de la secuencia génica IGKV3-20 en 16 de 27 pacientes y mutaciones recurrentes de KMT2D y CARD11 en 11 (69%) y 5 pacientes (31%), respectivamente[6,7].

Todos los pacientes presentan hemólisis, pero pueden no estar anémicos si la hemólisis está compensada. En el estudio de Berentsen *et al.*[4], la mayoría presentaban anemia, con cifras medianas de hemoglobina (Hb) de 8,9 g/dL. La mitad de los pacientes precisaron transfusiones durante periodos más o menos largos de tiempo y el 70% recibió tratamiento farmacológico. El 90% de los pacientes experimentaron acrocianosis inducida por el frío y/o fenómeno de Raynaud desde leve a incapacitante. En aislados casos se ha descrito gangrena de extremidades, tanto en enfermedad de CA primaria como asociada tumores o infecciones[8]. La severidad de la anemia está relacionada con la temperatura de los distintos periodos estacionales, pero en al menos dos tercios de los pacientes se producen exacerbaciones con la fiebre[9], debido al aumento de los niveles de C3 y C4. La mayoría de los pacientes son ancianos, con una supervivencia similar a la de población de su edad. En el estudio de Berentsen *et al.*[4], con un seguimiento de 12,5 años, la transformación a un linfoma agresivo ocurrió en un 4% de los pacientes.

Se debe sospechar enfermedad por CA en un paciente mayor con anemia hemolítica crónica o con clínica hemolítica inducida por el frío. La hemólisis debe confirmarse por test bioquímicos y se requiere positividad del test de Coombs para C3d para demostrar su patogénesis inmune, con títulos de la CA > 64 a 4 °C.

Debido a la aglutinación de los hematíes, el hemograma presenta un número de hematíes bajo y un volumen corpuscular medio (VCM) y una concentración de Hb corpuscular media (CHCM) altos, siendo la Hb el único parámetro fiable. Los parámetros se corrigen tras la incubación de la muestra a 37 °C durante 5 minutos en la mayoría de los pacientes. Los reticulocitos están generalmente aumentados y en el frotis se observa aglutinación con/sin esferocitos, y no es infrecuente encontrar eritroblastos.

Tabla 2. Criterios diagnósticos de la enfermedad por crioaglutininas (CA) primaria

	Criterios	Procedimientos y comentarios
Requeridos para el diagnóstico	Hemólisis crónica Coombs poliespecífico + Coombs C3d++ Título de CA > 64 a 4 °C No enfermedad maligna o infecciosa asociada	Coombs IgG–, pero ocasionalmente + débil Mantener la muestra a 37 °C hasta separar el suero o plasma Evaluación clínica y radiológica
Confirmatorios	IgM kappa monoclonal en suero (raramente IgG, IgA o λ)* Excluir síndrome linfoproliferativo crónico (SLP) clonal por citometría e inmunohistoquímica en médula ósea	Realizar inmunofijación, aunque no sea visible banda en el espectro electroforético (EEF)

* Ratio κ/λ en células B > 3,5 o < 0,9

Se debe realizar proteinograma para la detección del componente monoclonal, así como estudios radiológicos y biopsia de médula ósea (BMO) para el estudio SLP.

En la Tabla 2 se exponen las pruebas diagnósticas necesarias para confirmar el diagnóstico de enfermedad crónica por CA y excluir patología asociada.

› *Tratamiento de la enfermedad por crioaglutininas crónica primaria*

Aunque solo el 50% presenta anemia con requerimiento transfusional, más del 90% tiene manifestaciones vasculares que van desde una acrocianosis moderada al fenómeno de Raynaud incapacitante provocado por la exposición al frío, por lo que no se puede calificar como una enfermedad indolente en términos de calidad de vida.

› *Manejo no farmacológico*

Se debe proteger al paciente del frío, especialmente la cara y las extremidades, ya que alivia los síntomas y en muchos casos previene las crisis de hemólisis, y evitar la ingesta de líquidos fríos.

Se pueden realizar transfusiones de hematíes con las siguientes consideraciones:

- Las pruebas de compatibilidad y escrutinio deben realizarse a 37 °C.
- A diferencia de los problemas de compatibilidad en las AHAI por anticuerpos calientes, es generalmente fácil encontrar sangre compatible y el escrutinio de anticuerpos irregulares es generalmente negativo.
- Se debe mantener cálido al paciente, especialmente la extremidad donde se realiza la transfusión, utilizando calentadores de sangre.
- Transfundir productos sanguíneos con escaso contenido en plasma para evitar aportar complemento.

La plasmaféresis resulta eficaz de manera transitoria en situación de hemólisis aguda o previa a cirugía que requiera hipotermia[10].

La esplenectomía no tiene eficacia debido a que la hemólisis es intravascular o hepática.

Se debe asegurar la normotermia durante y tras la cirugía. En cirugía de *bypass* cardiopulmonar se puede valorar cardioplejia cálida, aunque las complicaciones son raras incluso en hipotermia[11].

› *Indicaciones para el tratamiento farmacológico*

Las recomendaciones para no administrar fármacos en el pasado estaban basadas en la ineficacia de los tratamientos utilizados en las AHAI por anticuerpos calientes y la infraestimación de la severidad de la anemia y los síntomas clínicos. Un considerable número de pacientes tienen una enfermedad leve, con discreta anemia y con síntomas circulatorios bien tolerados o ausentes. Por tanto, la indicación de tratamiento debe realizarse de manera individualizada, siendo los criterios para iniciar el tratamiento la anemia sintomática la dependencia transfusional y los síntomas circulatorios discapacitantes[5]. En la Figura 2 se pueden ver las terapias dirigidas actuales y emergentes en AHAI.

Tratamiento de soporte e inmunosupresores inespecíficos

Como medidas generales se recomiendan la administración de ácido fólico y el tratamiento precoz de las infecciones bacterianas.

El tratamiento con esteroides no está indicado, ya que se requieren dosis altas y consigue respuestas en menos del 14% de los pacientes. Los tratamientos con clorambu-

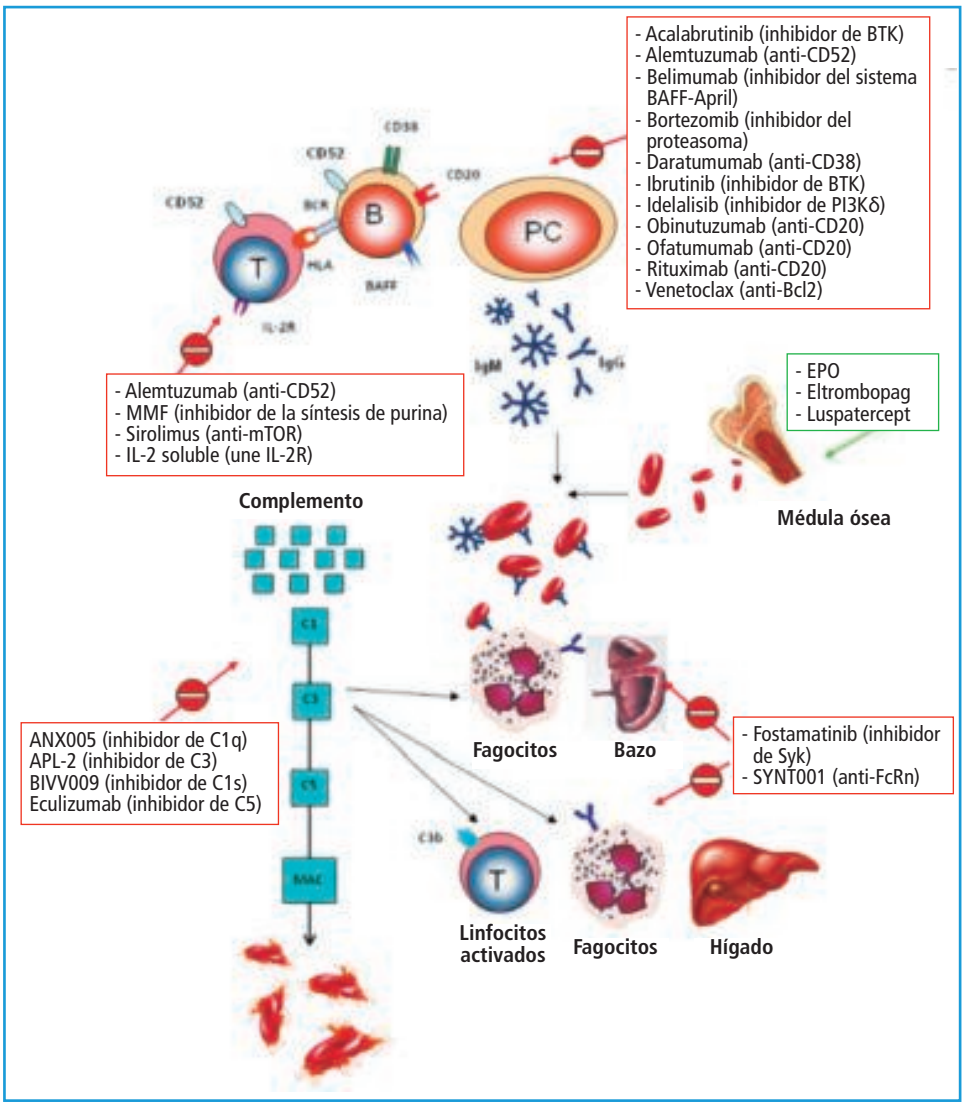


Figura 2. Terapias dirigidas actuales y emergentes en anemias hemolíticas autoinmunes (AHAI). BAFF: factor activador de células B; Bcl2: linfoma células B 2; BCR: receptor de células B; BTK: tirosina cinasa de Bruton; EPO: eritropoyetina; FcRn: receptor Fc neonatal; HLA: antígeno leucocitario humano; IL-2R: receptor de interleucina-2; MAC: complejo de ataque a la membrana; mTOR: diana mamífera de la rapamicina; PC: células plasmáticas; PI3K: fosfatidilinositol-3-cinasa; Syk: tirosina cinasa esplénica. Barcellini W, *et al*. Expert Rev Clin Immunol. 2018 Oct;14(10):857-72.

cilo y ciclofosfamida en monoterapia son de similar eficacia a los esteroides y la azatioprina ha resultado ineficaz[4].

El tratamiento sintomático con eritropoyetina se ha usado en los EEUU, pero no en países europeos y no hay estudios publicados.

Tratamientos dirigidos contra el clon B

El mayor avance terapéutico en la CAD ha sido la utilización del rituximab, solo o asociado a análogos de purinas.

El rituximab en monoterapia (375 mg/m^2/semana × 4 semanas) obtiene un 50% de respuestas globales (RG), siendo el 95% respuestas parciales (RP), con un tiempo hasta la respuesta de 1,5 meses y una duración de 11 meses[12,13].

En un intento de mejorar la tasa y la duración de las respuestas, se ha utilizado el rituximab asociado a fludarabina, alcanzando tasas de RG del 76%, con un 21% de respuestas completas (RC), un tiempo hasta la respuesta de 4 meses y una duración de la misma de 66 meses. El problema fue la toxicidad de grado 3-4 observada en el 41% de los pacientes, un 60% de los cuales experimentó infecciones de grado 1-3[14].

La asociación del rituximab con bendamustina (BR) ha conseguido un 71% de RG (40% de RC), con una mediana de duración de la respuesta de 32 meses. Se observó neutropenia de grado 4 en un 20%, pero solo un 11% de infecciones[15].

En un estudio italiano reciente se ha evaluado el uso de bortezomib en 19 pacientes en un único ciclo en monoterapia a dosis de 1,3 mg/m^2 intravenosos (i.v.) los días 1, 4, 8 y 11 con 3 RC y 3 RP, por lo que podría considerarse su utilización en pacientes que no respondan a BR o en los que esté contraindicado[16].

Tratamientos dirigidos frente al complemento

Se han desarrollado un gran número de sustancias moduladoras del complemento que se espera que sean efectivas en AHAI. La Figura 3 muestra una visión general de tales sustancias y sus dianas terapéuticas.

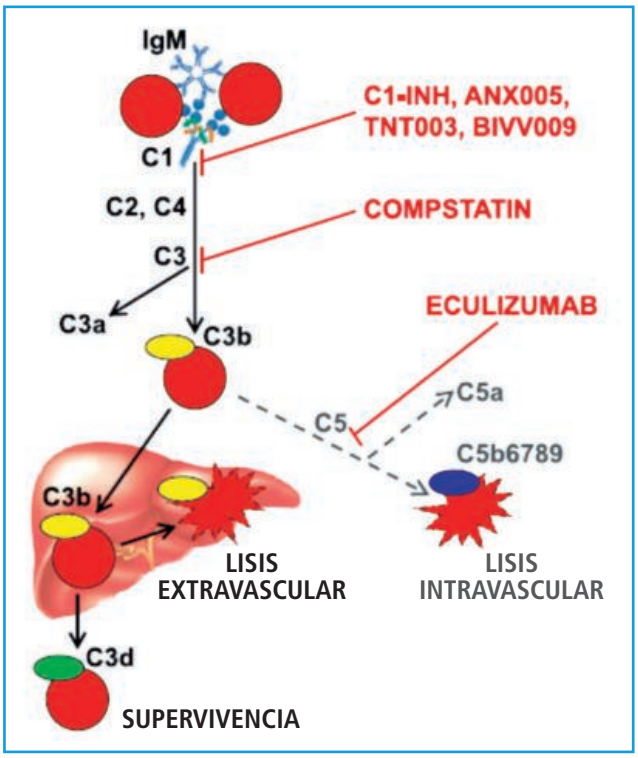


Figura 3. Tratamientos dirigidos frente al complemento. Vía clásica y terminal del complemento en la enfermedad por aglutininas frías (CAD) con dianas para los inhibidores del complemento. ANX005: anticuerpo monoclonal humanizado anti-C1q; BIVV009: anticuerpo monoclonal humanizado anti-C1s; C1-INH: inhibidor de esterasa derivado del plasma; compstatin: anti C3b; eculizumab: anti C5; TNT003: anticuerpo monoclonal de ratón anti-C1s. Berentsen *et al*. Blood. 2014;123:4010.

El primer inhibidor del complemento disponible para uso clínico fue un inhibidor de la esterasa C1 derivado del plasma (C1-INH), aprobado para el angioedema hereditario. En un caso clínico publicado, la administración de C1-INH detuvo inmediatamente la hemólisis en un paciente con una AHAI por anticuerpos calientes, resistente a esteroides, ofreciendo así un puente para una terapia de acción más lenta[17].

La modulación del complemento en CAD se describió en un caso clínico con el anticuerpo monoclonal anti-C5 eculizumab[18]. Esta observación llevó a los autores a realizar un ensayo clínico prospectivo de eculizumab en 13 pacientes[19]. Aunque el aumento de los niveles de Hb fue marginal, hubo una reducción significativa de los requerimientos transfusionales y los niveles de lactato deshidrogenasa.

Respecto a los estudios encaminados a la modulación del complemento más proximal en CAD, los estudios más completos son los experimentos *in vitro* con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-C1s TNT003, seguidos de un ensayo clínico de fase 1B que estudia su contrapartida humanizada BIVV009 (sutimlimab). El estudio *in vitro* probó los efectos de TNT003 sobre la actividad del complemento inducida por CA contra eritrocitos humanos. Usando muestras de CA de 40 pacientes con CAD, los autores encontraron que el anticuerpo monoclonal inhibía eficazmente la deposición inducida por CA de fragmentos C3 en los eritrocitos y prevenía la eritrofagocitosis por una línea celular fagocítica. TNT003 también inhibió la generación de anafilotoxinas C4a, C3a y C5a generadas por la vía clásica. Solo una muestra de un paciente de 40 estudiados pudo activar el complejo de ataque de membrana produciendo hemólisis[20].

En el ensayo fase 1B, 6 pacientes con CAD primaria típica recibieron BIVV009 por vía i.v., con una dosis de prueba de 10 mg/kg, seguida por una dosis de 60 mg/kg 1-4 días después y 3 dosis adicionales de 60 mg/kg a intervalos de 1 semana, además de una dosis semanal fija de 5,5 g de mantenimiento. Los pacientes recibieron vacunación contra meningococo, neumococo y *Haemophilus*. BIVV009 fue bien tolerado, deteniendo de forma inmediata la hemólisis en todos estos pacientes, aumentando los niveles de Hb en una media de 4,3 g/dL y eliminando los requerimientos transfusionales durante la terapia. No se presentaron complicaciones infecciosas[21]. El BIVV009 ha entrado ahora en ensayos de fase 3 (ClinicalTrials.gov NCT03347396 y NCT03347422).

ANX005, un anticuerpo monoclonal humanizado que se dirige a C1q, también se ha demostrado eficaz *in vitro* para prevenir la deposición de fragmentos C4 y C3 en los eritrocitos expuestos a sueros CAD, lo que resulta en una reducción de la hemólisis dependiente de la dosis[22].

La familia compstatina es un grupo de péptidos cíclicos que inhiben la activación del complemento al unirse a C3, interfiriendo con la formación de convertasa y la proteólisis C3, siendo este paso esencial en el bloqueo del sistema del complemento. Los experimentos con Cp40 encontraron una inhibición de la hemólisis dependiente de la dosis y la deposición de C3 en los eritrocitos de la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) *in vitro*. Los estudios preclínicos *in vivo* indicaron una farmacocinética favorable después de la administración subcutánea[23], pero no hay datos publicados en Cp40 en CAD. APL-2 es un análogo de

compstatina pegilado diseñado para inyección subcutánea en 2 ensayos de fase 1 con 51 voluntarios sanos al mismo tiempo[24]. Los participantes recibieron vacunación contra meningococo, neumococo y *Haemophilus*. El estudio mostró una alta eficacia del fármaco para inhibir las vías clásica y alternativa, con evaluaciones farmacodinámicas favorables. Hubo pocos eventos adversos y ningún evento adverso grave. Recientemente se ha puesto en marcha un ensayo clínico de fase 2 de APL-2 en CAD (ClinicalTrials.gov NCT03226678).

› Síndrome de crioaglutininas secundario (CAS)

El término síndrome por CA debe reservarse para la AHAI por CA asociada a una enfermedad maligna bien definida, un fármaco o secundaria a procesos infecciosos.

Se ha descrito asociada a linfoma B difuso de células grandes, enfermedad de Hodgkin, carcinomas, sarcomas, melanomas metastásicos y síndromes mieloproliferativos. Clínicamente, muestran hallazgos similares a los de la CAD, así como características clínicas dependientes de la enfermedad maligna asociada. El diagnóstico se basa en la presencia de AHAI mediada por CA en un paciente ya diagnosticado de otro tumor.

Se pueden asociar a múltiples infecciones, pero las más frecuentes son la neumonía por *Mycoplasma pneumoniae* (MN) y la infección por el virus de Epstein-Barr (VEB).

En la mayoría de los pacientes con infección por MN se detectan CA, pero generalmente no se produce hemólisis significativa. Solo en algunos se producen CA en títulos altos y con gran amplitud térmica, provocando hemólisis que puede ser severa. Los anticuerpos son policlonales, generalmente con especificidad anti-I y casi siempre IgM. La mayoría de los pacientes son adultos y el cuadro hemolítico ocurre típicamente durante la segunda o la tercera semana después del comienzo del cuadro febril, con un comienzo súbito con palidez, ictericia y hemoglobinuria. En general, el pronóstico es bueno y la hemólisis se autolimita en 4-6 semanas.

La mononucleosis infecciosa es una causa infrecuente de AHAI, ocurriendo en el 1% de los casos. La CA es policlonal y de especificidad anti-i. La clase de inmunoglobulina es IgM o IgG y la anemia hemolítica es transitoria y generalmente leve.

Se han descrito casos aislados de AHAI por CA en infecciones por citomegalovirus (CMV), adenovirus, varicela, rubeola, *Legionella* y listeriosis. La especificidad de los autoanticuerpos puede ser anti-I, anti-i y anti-Pr.

El diagnóstico se sospecha en pacientes adolescentes o adultos jóvenes con infección por MN o mononucleosis infecciosa que presentan anemia o hemoglobinuria, confirmándolo mediante el test de Coombs y la titulación de la CA.

Se han descrito casos aislados de hemólisis relacionada con CA en pacientes con lupus eritematoso sistémico, después de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (asociados o no a infección viral) y durante el embarazo. También se han descrito casos aislados asociados con fármacos, entre los que se encuentra la lenalidomida[25] y los anti PD-1 como el pembrolizumab, nivolumab y atezolizumab[26-27].

› Hemoglobinuria paroxística *a frigore* (HPF)

La HPF fue descrita como entidad clínica asociada a la sífilis en 1872. El anticuerpo con actividad hemolítica lo describieron Donath y Landsteiner en 1904. El anticuerpo de Donath-Landsteiner (DL) es un anticuerpo IgG generalmente encontrado en niños tras una infección viral (gripe, rubeola, paperas, varicela o mononucleosis infecciosa) o administración de vacunas. El anticuerpo generalmente aparece 1 semana después del comienzo de la enfermedad y puede persistir durante 1-3 meses. El anticuerpo es siempre policlonal y dirigido contra el antígeno P de la superficie de la membrana eritrocitaria. El anticuerpo activa la cascada del complemento, causando activación del complejo de ataque a la membrana y hemólisis intravascular.

Es un síndrome hemolítico agudo que se inicia algunas horas tras la exposición al frío, con ictericia, fiebre, cefalea, dolor lumbar o abdominal, calambres musculares y orinas oscuras (como las bebidas de cola). Generalmente es un proceso autolimitado, pero la severidad de la anemia puede provocar muerte súbita.

El diagnóstico se basa en el cuadro clínico, signos bioquímicos de hemólisis, con hemoglobinemia y hemoglobinuria, y la demostración de la CA. El frotis de sangre periférica muestra policromasia, esferocitos, poiquilocitos, eritroblastos y, en algunos casos, eritrofagocitosis neutrofílica. El test de Coombs es positivo,

pero puede ser débil o negativo debido a que la IgG puede eluirse durante la preparación de las células.

La forma más sensible de realizar el test es usando hematíes 0 papainizados, ya que la papainización expone más antígenos P en la membrana de las células. El complemento se añade después de que las células se han sensibilizado con el anticuerpo de DL a 0 °C y se llevan a 37 °C.

El tratamiento es casi siempre de soporte, ya que es un proceso autolimitado, que se resuelve generalmente tras calentar al paciente. Los esteroides son eficaces y en algunos adultos se ha tratado con ciclofosfamida.

› Conclusiones

La enfermedad por CA es hoy en día una enfermedad bien definida caracterizada por AHAI asociada a un SLP-B con componente monoclonal IgM kappa. Cuando el tratamiento está indicado, debemos considerar en primera línea las terapias dirigidas a células B, entre las cuales bendamustina-rituximab es la combinación que ha conseguido mejores resultados con menos efectos secundarios. El uso terapéutico de los inhibidores del complemento está en sus comienzos y solo uno de estos fármacos ha alcanzado los ensayos de fase 3. Su indicación futura probablemente sea la de pacientes con AHAI-F severa refractaria a terapias frente a células B o con contraindicación para recibir drogas citotóxicas, teniendo en cuenta que probablemente tendrán que mantenerse indefinidamente para mantener su efecto. También se debe tener en cuenta que la aglutinación de los hematíes no es mediada por complemento y, por ello, la inhibición del complemento puede no suponer una mejoría de los síntomas circulatorios.

› Bibliografía

1. Bass GF, Tuscano ET, Tuscano JM. Diagnosis and classification of autoimmune hemolytic anemia. Autoimmun Rev. 2014;13(4-5):560-4.
2. Barcellini W, Fattizzo B, Zaninoni A. Current and emerging treatment options for autoimmune hemolytic anemia. Expert Rev Clin Immunol. 2018;14(10):857-72.
3. Sokol RJ, Hewitt S, Stamps BK. Autoimmune haemolysis: an 18-year study of 865 cases referred to a regional transfusion centre. Br Med J (Clin Res Ed). 1981;282(6281):2023.
4. Berentsen S, Ulvestad E, Langholm R, Beiske K, Hjorth-Hansen H, Ghanima W, et al. Primary chronic cold agglutinin disease: a population based clinical study of 86 patients. Haematologica. 2006;91(4):460-6.
5. Berentsen S. How I manage patients with cold agglutinin disease. Br J Haematol. 2018;181(3):320-30.
6. Małecka A, Trøen G, Tierens A, Østlie I, Małecki J, Randen U, et al. Immunoglobulin heavy and light chain gene features are correlated with primary cold agglutinin disease onset and activity. Haematologica. 2016;101(9):e361-4.
7. Małecka A, Trøen G, Tierens A, Østlie I, Małecki J, Randen U, et al. Frequent somatic mutations of KMT2D (MLL2) and CARD11 genes in primary cold agglutinin disease. Br J Haematol. 2018;183(5):838-42.
8. Karunarathne S, Weerasinghe S, Govindapala D, Fernando H, Jayaratne B. Cold autoimmune haemolytic anaemia secondary to Epstein Barr virus infection presenting with peripheral gangrene; case report. Thromb J. 2012;10:2-4.
9. Ulvestad E. Paradoxical haemolysis in a patient with cold agglutinin disease. Eur J Haematol. 2010;60(2):93-100.
10. Zoppi M, Oppliger R, Althaus U, Nydegger U. Reduction of plasma cold agglutinin titers by means of plasmapheresis to prepare a patient for coronary bypass surgery. Transfus Med Hemotherapy. 1993; 20(1-2):19-22.
11. Jain MD, Cabrerizo-Sánchez R, Karkouti K, Yau T, Pendergrast JM, Cserti-Gazdewich CM. Seek and you shall find-but then what do you do? Cold agglutinins in cardiopulmonary bypass and a single-center experience with cold agglutinin screening before cardiac surgery. Transfus Med Rev. 2013;27(2):65-73.
12. Berentsen S, Ulvestad E, Gjertsen BT, Hjorth-Hansen H, Langholm R, Knutsen H, et al. Rituximab for primary chronic cold agglutinin disease: a prospective study of 37 courses of therapy in 27 patients. Blood. 2004;103(8):2925-8.
13. Schöllkopf C, Kjeldsen L, Bjerrum OW, Mourits-Andersen HT, Nielsen JL, Christensen BE, et al. Rituximab in chronic cold agglutinin disease: a prospective study of 20 patients. Leuk Lymphoma. 2006;47(2): 253-60.
14. Berentsen S, Randen U, Vagan AM, Hjorth-Hansen H, Vik A, Dalgaard J, et al. High response rate and durable remissions following fludarabine and rituximab combination therapy for chronic cold agglutinin disease. Blood. 2010;116(17):3180-4.
15. Berentsen S, Randen U, Oksman M, Birgens H, Tvedt THA, Dalgaard J, et al. Bendamustine plus rituximab for chronic cold agglutinin disease: results of a Nordic prospective multicenter trial. Blood. 2017;130(4):537-41.
16. Rossi G, Gramegna D, Paoloni F, Fattizzo B, Binda F, D'Adda M, et al. Short course of bortezomib in anemic patients with relapsed cold agglutinin disease: a phase 2 prospective GIMEMA study. Blood. 2018;132(5):547-50.
17. Wouters D, Zeerleder S. Complement inhibitors to treat igM-mediated autoimmune hemolysis. Haematologica. 2015;100(11):1388-95.
18. Hu A, Rother RP, Du U. To the editor: Long-term efficacy of the complement inhibitor eculizumab in cold agglutinin disease. To the editor: Homozygous deletion of HFE: the Sardinian hemochromatosis? Blood. 2016;113(16):3885-7.
19. Röth A, Bommer M, Hüttmann A, Herich-Terhürne D, Kuklik N, Veronika L, et al. Complement Inhibition with Eculizumab in Patients with Cold Agglutinin Disease (CAD): Results from a Prospective Phase II Trial (DECADE Trial). Blood. 2015;126(23):274.

20. Shi J, Rose EL, Singh A, Hussain S, Stagliano NE, Parry GC, Panicker S. TNT003, an inhibitor of the serine protease C1s, prevents complement activation induced by cold agglutinins. Blood. 2014;123(26):4015-22.
21. Jäger U, D'Sa S, Schörgenhofer C, Bartko J, Derhaschnig U, Sillaber C, et al. Inhibition of complement C1s improves severe hemolytic anemia in cold agglutinin disease: a first-in-human trial. Blood. 2018;133(9):893-901.
22. Gertz MA, Qiu H, Kendall L, Saltarelli M, Yednock T, Sankaranarayanan S. ANX005, an Inhibitory Antibody Against C1q, Blocks Complement Activation Triggered By Cold Agglutinins in Human Disease. Blood. 2016;128:1265.
23. Risitano AM, Ricklin D, Huang Y, Reis ES, Chen H, Ricci P, et al. Peptide inhibitors of C3 activation as a novel strategy of complement inhibition for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood. 2014;123(13):2094-101.
24. Grossi FV, Bedwell P, Deschatelets P, Edis L, Francois CG, Johnson PJ, et al. APL-2, a Complement C3 Inhibitor for the Potential Treatment of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH): Phase I Data from Two Completed Studies in Healthy Volunteers. Blood. 2016;128:1251.
25. Brauer DL, Edelman B, Rapoport AP, Hess JR, Akpek G. Plasma exchange and rituximab treatment for lenalidomide-associated cold agglutinin disease. Transfusion. 2012;52(11):2432-5.
26. Okawa S, Kayatani H, Fujiwara K, Ozeki T, Takada K, Iwamoto Y, et al. Pembrolizumab-induced Autoimmune Hemolytic Anemia and Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Non-small Cell Lung Cancer. Intern Med. 2019;58(5):699-702.
27. Dutertre M, de Menthon M, Noël N, Albiges L, Lambotte O. Cold agglutinin disease as a new immune-related adverse event associated with anti-PD-L1s and its treatment with rituximab. Eur J Cancer. 2019;110:21-3.

SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS

Coordinadores: **Dr. Javier de la Serna Torroba.** Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid
Dra. Lucrecia Yáñez Sansegundo. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander

Complicaciones infecciosas en los síndromes linfoproliferativos

Mariana Chumbita, Carolina García-Vidal
Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Clínic-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universidad de Barcelona

El grupo de síndromes linfoproliferativos es heterogéneo y amplio, con gran variabilidad en su presentación clínica. Se incluyen diferentes patologías dentro de su clasificación, la más frecuente es la leucemia linfocítica crónica (LLC), que representa el 30% de las leucemias, siendo la más frecuente en los pacientes de edad adulta[1]. El pronóstico de los pacientes con LLC es variable y depende de factores como la estadificación de la enfermedad o la edad al momento del diagnóstico[2,3]. Estos pacientes tienen un riesgo elevado de infección debido a la suma de varios factores, en especial a aquellos relacionados a la propia enfermedad (estadificación, recaída, refractariedad a líneas de tratamiento previas o la propia disfunción inmunitaria, con alteración del complemento y/o hipogammaglobulinemia) y aquellos relacionados con los tratamientos recibidos[4].

En los últimos años han aparecido nuevas dianas de tratamiento, dirigidas contra las vías de señalización del receptor de células B, por medio de la inhibición en las vías de señalización para su proliferación, que implican una revolución en el pronóstico de estos pacientes[1]. El aumento en la supervivencia de estos pacientes con déficits inmunológicos importantes y progresivos y la propia inmunomodulación producida por los nuevos tratamientos ha aumentado el riesgo de infección. Nuestro objetivo es discutir el riesgo de infección de los pacientes con síndromes linfoproliferativos tratados con nuevas dianas terapéuticas, describir la epidemiología y recomendar un paquete de medidas para la prevención de las infecciones.

› Nuevos tratamientos: ibrutinib e idelalisib

Ibrutinib actúa inhibiendo la tirosina cinasa de Bruton (TkB), enzima implicada en la activación, maduración y supervivencia de los linfocitos B, generando así la apoptosis de las células de LLC. Byrd *et al.* describen, en un estudio multicéntrico fase 1b-2 en pacientes con LLC en recaída o refractaria, una respuesta global del 71% y una supervivencia del 83%, promoviendo incluso respuestas duraderas[5]. Burger *et al.*, en otro estudio multicéntrico fase 3 en pacientes de 65 años o más y sin tratamientos previos, demuestran una supervivencia libre de progresión de la enfermedad más duradera comparada con clorambucilo y una tasa de supervivencia a los 24 meses del 98%[3]. Por último, en comparación con ofatumumab en pacientes con LLC recaída o refractaria, ibrutinib prolonga significativamente la tasa de supervivencia global al ser comparado con el anti-CD20, con una reducción de riesgo de muerte del 57%[6].

Otros autores han descrito más casos de infecciones causadas por *Pneumocystis jirovecii, Aspergillus,* mucorales y *Cryptococcus*[7]. Es destacable que la mayoría de estas infecciones fúngicas reportadas tienen localizaciones atípicas, incluidas aspergilosis del sistema nervioso central o localizaciones extrapulmonares de neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (PCP). Esta información permite suponer que, adicionalmente al efecto conocido sobre los linfocitos B, exista una alteración (no conocida totalmente hasta el momento) en la respuesta celular que afecta también la vía de señalización para la activación de las células T. Los factores propios de la enfermedad, la exposición ambiental y la sinergia con los demás tratamientos inmunosupresores a la que se enfrentan estos pacientes son otros factores facilitadores de estas infecciones fúngicas[8]. Por último, es importante destacar que se han documentado casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), principalmente en pacientes que han recibido múltiples líneas de tratamiento previas, en especial rituximab. La mayoría de las infecciones descritas se han producido al principio del uso del fármaco, disminuyendo tras los primeros 6 meses del tratamiento[5]. La mortalidad de los pacientes que sufren estas infecciones ha sido especialmente alta. Fac-

tores como el bajo índice de sospecha o la presentación clínica atípica que pueden haber retrasado el diagnóstico y el tratamiento pueden también haber tenido un impacto en este peor pronóstico.

Idelalisib actúa bloqueando la señal de proliferación de linfocitos B por medio de la inhibición de PI3Kδ, enzima relativamente específica de esta clase de linfocitos, generando también la muerte de las células B malignas. En un estudio fase 1 de seguridad y eficacia en pacientes con LLC que habían recibido tratamientos previos, se describió que el 67% de los pacientes presentaba efectos adversos graves, siendo la neumonía el más frecuente. El uso de idelalisib se asoció también a neutropenia febril, infección por PCP y por otros hongos, reactivación de citomegalovirus (CMV) y bacteriemia por *Pseudomonas*[9]. Otro estudio demostró mayor supervivencia y respuesta global en los pacientes con idelalisib combinado con rituximab *versus* placebo, pero también una mayor incidencia de neumonía y reactivaciones de CMV[10].

› Nuestra experiencia en la vida real

Recientemente presentamos a un congreso nuestra experiencia, del Hospital Clínic de Barcelona, en infecciones asociadas al uso de ibrutinib e idelalisib en pacientes de la vida real. Se analizaron 82 pacientes con LLC y linfoma del manto desde junio de 2014 hasta septiembre de 2018. Se describieron complicaciones infecciosas en el 69,5% de los pacientes, el 13% de causa bacteriana, seguido por el 9% de causa viral y, por último, el 3% de etiología fúngica. Es importante aclarar que 66 de estas fueron documentadas en 17 pacientes (20,7%) y definidas como infecciones serias, consideradas como aquellas que precisaron ingreso hospitalario. La Tabla 1 describe las infecciones documentadas.

Tabla 1. Descripción de las infecciones documentadas en la vida real en pacientes con idelalisib o ibrutinib. Datos del Hospital Clínic de Barcelona

Microorganismo aislado	Inhibidor de la tirosina cinasa	
	Ibrutinib	Idelalisib
Bacteriana		
Streptococcus pneumoniae	3	0
Staphylococcus epidermidis	0	1
Streptococcus constellatus	1	0
Enterococcus cloacae	1	0
Enterococcus faecalis	2	0
Enterococcus faecium	1	0
Aeromonas spp.	1	0
Escherichia coli	3	0
Pseudomonas aeruginosa	1	0
Viral		
Citomegalovirus	3	0
Influenzavirus B	2	0
Virus *Varicella zoster*	2	0
Fúngica		
Aspergillus spp.	1	0
Cryptococcus neoformans	2	0
Sin aislamiento microbiológico	41	1

› Prevención

Actualmente, las recomendaciones de prevención con idelalisib están dirigidas a la prevención de neumonía por PCP, ya que se demostró un claro beneficio con el uso de profilaxis. En una revisión realizada por L.H. Sehn *et al.* de los casos de neumonía por PCP en pacientes con LLC se comprueba claramente el beneficio de la profilaxis con un 1,2% de casos en aquellos que la recibían *versus* 3,5% en aquellos sin ella. El uso de la profilaxis está recomendado durante el tratamiento y hasta 2 a 6 meses una vez finalizado el mismo. Respecto al resto de las infecciones documentadas, las recomendaciones se enfocan a una vigilancia cercana de los pacientes con serología previa positiva para CMV o ante síntomas que sugieran enfermedad.

En el caso de ibrutinib, en cambio, no hay hasta el momento una clara recomendación del uso de profilaxis, pero sí se sugiere una monitorización cercana, en el caso de neutropenia febril. Debido a la alta mortalidad a la que se asocia la LMP, se sugiere mantener una alta sospecha de esta ante la aparición de nuevos síntomas neurológicos en pacientes que estén recibiendo ibrutinib especialmente[10].

En nuestro centro, en función de un protocolo realizado por un grupo interdisciplinario de estudio de

enfermedades infecciosas en pacientes que reciben terapias biológicas y otros inmunomoduladores (BIOINF+), se procede de la siguiente manera:

a) A aquellos pacientes hematológicos con posible indicación de ibrutinib se los deriva a medicina preventiva para su vacunación, al menos 3 meses antes de iniciar el fármaco.

b) En los pacientes con 3 o más líneas de tratamiento previo y/o corticoides, se administra desde el inicio del tratamiento con ibrutinib profilaxis contra *P. jirovecii* con cotrimoxazol.

c) Aquellos pacientes en tratamiento con ibrutinib que presenten fiebre y/o infiltrados pulmonares sin una causa esclarecida serán evaluados por el Servicio de Infectología y se solicitará antígeno criptococo y galactomanano en sangre.

d) Se valora la realización de una resonancia magnética cerebral (RMC) anual a todos los pacientes que hayan recibido un mínimo de 6 meses el fármaco y cada 6 meses a los pacientes con tratamiento previo inmunosupresor, en especial a aquellos pacientes que habían recibido previamente rituximab.

› Bibliografía

1. Teh BW, Tam CS, Handunnetti S, Worth LJ, Slavin MA. Infections in patients with chronic lymphocytic leukaemia: Mitigating risk in the era of targeted therapies. Blood Rev. 2018;32(6):499-507.
2. Montserrat E. Chronic Lymphoproliferative disorders. Curr Opin Oncol. 1997;9:34-41.
3. Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, Robak T, Owen C, Ghia P, et al.; RESONATE-2 Investigators. Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. N Engl J Med. 2015;373(25):2425-37.
4. Hilal T, Gea-Banacloche JC, Leis JF. Chronic lymphocytic leukemia and infection risk in the era of targeted therapies: linking mechanisms with infections. Blood Rev. 2018;32(5):387-99.
5. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, et al. Targeting BTK with Ibrutinib in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. N Engl J Med. 2014;369(1):32-42.
6. Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, Barrientos JC, Kay NE, Reddy NM, et al.; RESONATE Investigators. Ibrutinib versus Ofatumumab in Previously Treated Chronic Lymphoid Leukemia. N Engl J Med. 2014;371(3):213-23.
7. Messina JA, Maziarz EK, Spec A, Kontoyiannis DP, Perfect JR. Disseminated cryptococcosis with brain involvement in patients with chronic lymphoid malignancies on ibrutinib. Open Forum Infect Dis. 2017;4(1):1-4.
8. Chamilos G, Lionakis MS, Kontoyiannis DP. Call for Action: Invasive Fungal Infections Associated with Ibrutinib and Other Small Molecule Kinase Inhibitors Targeting Immune Signaling Pathways. Clin Infect Dis. 2018;66(1):140-8.
9. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, Benson DM, Flinn IW, Wagner-Johnston ND, et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110δ, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2014;123(22):3390-7.
10. Reinwald M, Silva JT, Mueller NJ, Fortún J, Garzoni C, de Fijter JW, et al. ESCMID Study Group for Infections in Compromised Hosts (ESGICH) Consensus Document on the safety of targeted and biological therapies: an infectious diseases perspective (Intracellular signaling pathways: tyrosine kinase and mTOR inhibitors). Clin Microbiol Infect. 2018;24:S53-S70.

Diagnóstico y tratamiento de la tricoleucemia

Ana Marín Niebla, Elisa Roldán
Servicio de Hematología, Vall d'Hebron Instituto de Oncología (VHIO), Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona

› Definición de la enfermedad, epidemiología y presentación clínica

La tricoleucemia (TL) o "leucemia de células peludas" (traducción literal de su denominación en inglés *hairy cell leukemia* –HCL–) es un síndrome linfoproliferativo crónico (SLPC) incluido dentro de los linfomas no Hodgkin (LNH) de línea B en la clasificación de los tumores de los tejidos hematolinfoides de la Organización Mundial de la Salud (OMS)[1]. La enfermedad se reportó por primera vez a finales de los años cincuenta[2,3], pero fue la descripción morfológica de sus características células "peludas" al microscopio óptico lo que dio a esta entidad su nombre actual.

Es una enfermedad rara, con una incidencia de solo el 2% del total de los SLPC[4], hasta 4 veces más frecuente en varones que en mujeres, de predominio en la raza caucásica y con una edad mediana al debut de 58 años (rango: 50-60 años), siendo excepcional su diagnóstico en menores de 20 años. La supervivencia mediana no superaba los 4 años con los primeros tratamientos (esplenectomía, clorambucilo, interferón)[5], pero la aparición de los análogos de purinas pentostatina y cladribina cambió el paradigma de manejo de la TL, con respuestas globales (RG) del 75-100% y supervivencias libres de progresión (SLP) y globales (SG) de más de 10 años en el 79-96% de los pacientes[6,7].

Desde el punto de vista clínico, la TL es una enfermedad indolente y de evolución lenta. Los pacientes pueden estar asintomáticos o, más frecuentemente, presentar fatiga, fiebre, sudoración, pérdida de peso, infecciones, equimosis y dolor en el hipocondrio izquierdo, como consecuencia de la infiltración predominante de la médula ósea (MO) y el bazo, con pancitopenia y esplenomegalia que suelen preceder en años al diagnóstico de la enfermedad[8]. La infiltración hepática con hepatomegalia no es infrecuente y también pueden darse fenómenos autoinmunes de tipo vasculitis, y, aunque la ausencia de linfadenopatías es una característica distintiva de esta enfermedad en comparación con otros tipos de SLPC, ocasionalmente puede haberlas e incluso ser voluminosas. Las infecciones son una complicación frecuente, tanto por causa de la propia enfermedad como del tratamiento, y de hecho suponen la primera causa de mortalidad en estos pacientes[1].

› Biología y patogenia

La baja incidencia de la TL, la ausencia de líneas celulares o modelos murinos y la dificultad para recuperar células tumorales de médula e incluso de sangre de los pacientes (por la escasa carga tumoral circulante) dificultaron el estudio de su biología durante muchos años.

En 2011, la disponibilidad de técnicas de secuenciación masiva dio lugar al descubrimiento de una mutación puntual en la secuencia del gen BRAF (T>A en el exón 15) que produce una proteína cinasa BRAF anómala por la sustitución de una valina por glutamato (V600E) en su estructura proteica[9]. La **mutación BRAF-V600E** induce una activación constitutiva de la vía de señalización MEK-ERK, que tiene como consecuencias finales una mayor tasa proliferativa y una resistencia a la apoptosis de la célula tumoral. En la Figura 1 se muestra el modelo de activación de la vía RAF-MEK-ERK en condiciones fisiológicas y en presencia de la mutación BRAF-V600E, y los posibles puntos de intervención terapéutica.

La BRAF-V600E es una mutación somática recurrente presente en el 100% de los pacientes con TL clásica (TLc), es detectable en todas las células de la clona tumoral y se mantiene constante y estable a lo largo de la evolución de la enfermedad, desde el debut y en las sucesivas recidivas, permitiendo el diagnóstico diferencial con otros SLPC-B. Sin embargo, esta mutación está ausente en pacientes con TL variante (TLv) y también en aquellos con reordenamiento IGHV4:34. En estos casos se han identificado mutaciones en otros genes como MEK1, NOTCH2 y otros.

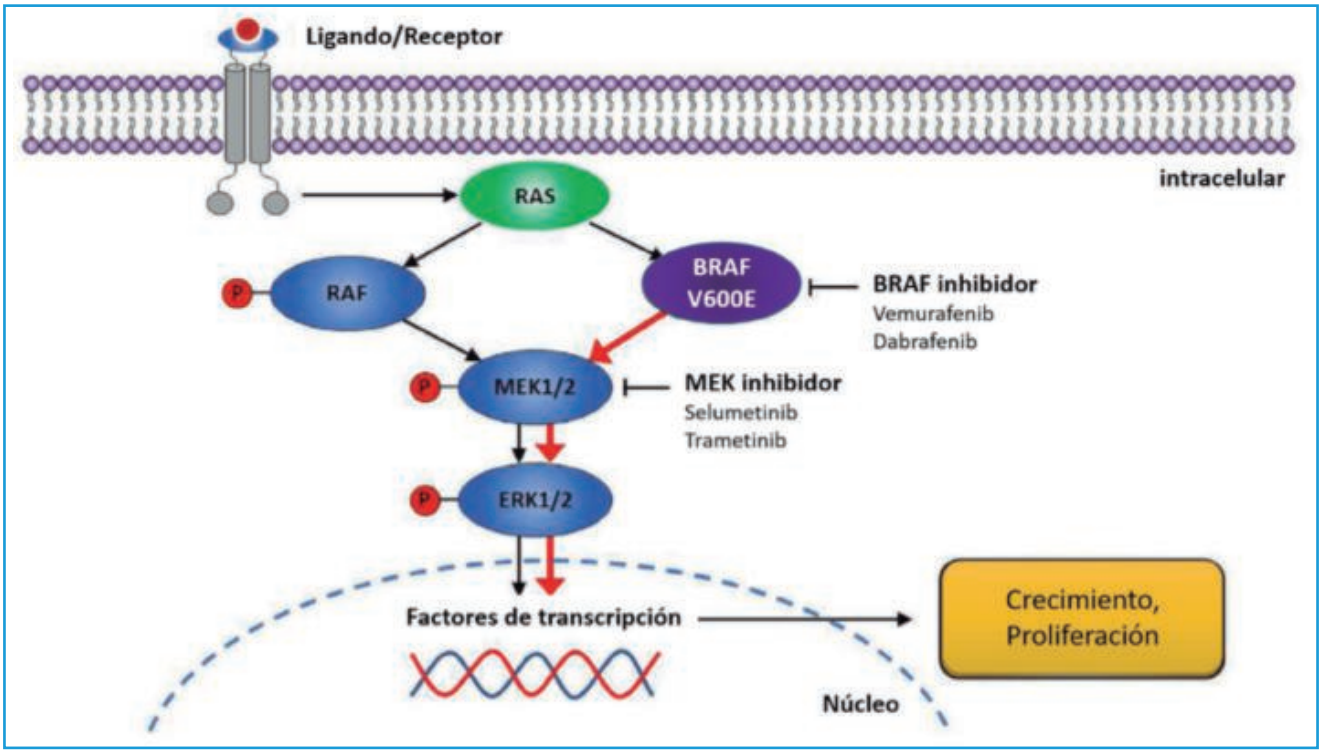


Figura 1. Vía de señalización RAF-MEK-ERK en la tricoleucemia, mostrando esquemáticamente la acción de la mutación BRAF V600E en la vía y los puntos de intervención terapéutica con los nuevos agentes dirigidos contra diana. Adaptada y traducida de T. Roider, F1000Res. 2018[10].

Los estudios genéticos han demostrado que BRAF-V600E es el evento genético **causal** de la enfermedad y la activación constitutiva de la vía MEK-ERK consecuencia de la mutación define los eventos más determinantes de la TL: su perfil de expresión génica, que identifica su origen como linfocito B de memoria posgerminal, sus características prolongaciones de membrana, su resistencia a la apoptosis y su distribución selectiva (médula, bazo, no en ganglios). De hecho, la inhibición de BRAF-V600E reduce drásticamente la fosforilación de MEK y ERK, y ello da lugar a la infrarregulación de la expresión de genes habitual en la TL, la desaparición de las prolongaciones de membrana de la célula tumoral e incluso su apoptosis, lo cual tiene importantes implicaciones terapéuticas[10]. Aunque BRAF-V600E es el evento iniciador, parecen ser necesarias otras alteraciones genéticas "colaboradoras" y se han descrito mutaciones somáticas menos frecuentes en genes como LKF2 y CDKN1B/p27 en la TL, así como mecanismos epigenéticos "permisivos" que modulan la expresión de estos y otros genes. A pesar de estos hallazgos, el genoma de la TL es muy estable y de menor complejidad que el de otros LNH.

› Diagnóstico

El grupo internacional de expertos de la Hairy Cell Leukemia Foundation (HCLF, www.hairycellleukemia.org) publicó en 2017 una guía de consenso para el diagnóstico y el manejo de la enfermedad[11] que permite confirmar el diagnóstico de TL, identificar posibles variantes atípicas y potencialmente menos sensibles a tratamientos estándar, así como descartar otras patologías en el diagnóstico diferencial.

El diagnóstico de TL se inicia habitualmente ante la **sospecha clínica** en pacientes con astenia, fatiga o infección, en los que se observan citopenias y esplenomegalia (presentes en el 90% de los casos al debut), además del resto de los signos y/o síntomas descritos previamente, aunque la naturaleza indolente de la enfermedad hace posible también que el primer signo de alerta sea el hallazgo incidental de citopenias en un paciente asintomático. La **exploración física** se considera suficiente en la práctica habitual, siendo opcional el uso de **técnicas radiológicas** (radiografía, ecografía o tomografía axial computarizada –TAC–)

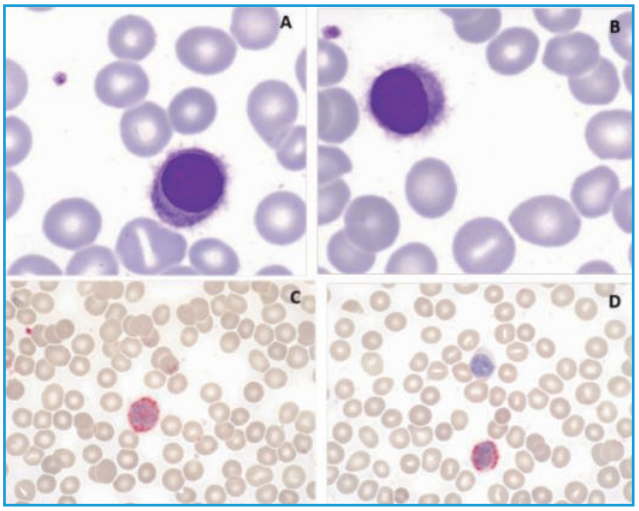


Figura 2. A-B: tricoleucocitos en el frotis de sangre periférica de un paciente con tricoleucemia (TL). Tinción de May-Grünwald-Giemsa; C: citoquímica, tinción de fosfatasa ácida en un tricoleucocito; D: tras inhibición con tartrato, la fosfatasa del tricoleucocito persiste. Cortesía de la Dra. Mayda Navarrete, Servicio de Hematología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona.

para confirmar los hallazgos clínicos, especialmente en el contexto de ensayos clínicos.

El **hemograma** con **estudio morfológico del frotis de sangre periférica (SP)** nos permite detectar posibles citopenias y hallazgos en el diferencial leucocitario (la monocitopenia es frecuente y característica de la TLc). Al microscopio óptico, los tricoleucocitos son linfocitos pequeños con núcleo ovalado de cromatina madura y citoplasma abundante con numerosas prolongaciones en toda la superficie de su membrana celular, dándoles el característico aspecto de "peludos" (Figura 2). Esta morfología los diferencia del resto de los linfocitos de SP y también de otras células patológicas con prolongaciones de membrana con las que es necesario hacer el diagnóstico diferencial (por ejemplo, los linfocitos "vellosos" del linfoma esplénico de linfocitos vellosos –LELV–).

Otros estudios de laboratorio necesarios son los perfiles bioquímicos básico, hepático y renal, β2-microglobulina y serología viral para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la hepatitis (HBV y HCV), con determinación de la carga viral en portadores, que permiten evaluar el riesgo de toxicidad y/o complicaciones infecciosas frente al tratamiento con análogos de purina, anti-CD20, etc. Además, se recomienda el despistaje de infecciones activas al diagnóstico con pancultivos, imagen u otros test en función de la orientación clínica.

El estudio de la población tumoral por **citometría de flujo en SP o en MO** permite confirmar el diagnóstico, ya que la TL coexpresa marcadores B como CD19, CD20, CD22, junto con CD103, CD25, CD11c y CD123, estos últimos característicos de la TLc y ausentes en otros SLPC y en linfocitos B no clonales. Además, expresa CD200 y es negativa para CD27, CD5 o CD10. El inmunofenotipo también permite diferenciar la TLv, que no expresa CD25 ni CD123.

La **biopsia de MO (BMO)** es imprescindible, ya que es la única prueba que permite valorar el grado de infiltración medular y de fibrosis (habitualmente extensa en la TL), así como diagnosticar casos con médula hipocelular (10% de los casos). Además del estudio microscópico, los test de inmunohistoquímica (IHQ) en MO deben incluir CD20, anexina-1 (ANXA1) y VE1 (que detecta la mutación BRAF V600E). No es raro que el aspirado (AMO) resulte "seco" debido precisamente a la fibrosis medular frecuente en esta enfermedad[12].

El **estudio molecular de la mutación BRAF V600E** es una recomendación formal actual para completar el diagnóstico de TL y discriminar variantes con menor sensibilidad a tratamientos estándar, así como para el uso de agentes dirigidos contra esta diana biológica[13]. El estudio molecular **debe hacerse por técnicas de alta sensibilidad** (ASO-PCR, ddPCR o NGS) para evitar falsos negativos, sobre todo en muestras de SP, donde la población tumoral circulante suele ser < 10%. Si no se dispone de técnicas moleculares lo suficientemente sensibles, el estudio IHQ VE1 en la BMO permite también confirmar la presencia de la mutación[11].

› Diagnóstico diferencial: variantes de tricoleucemia y otras entidades

La **TL variante (TLv)** se diferencia de la TLc en su fenotipo por citometría, con ausencia de expresión de CD25, CD123 y CD200; y en la IHQ, ya que tampoco expresa anexina 1. Es más frecuente en mayores de 70 años, presenta linfocitosis en el 90% de los casos, citopenias menos severas, responde peor a los análogos de purina y su pronóstico es más desfavorable que el de la TLc. Desde el punto de vista genético, es muy relevante la **ausencia de la mutación BRAF V600E**; en cambio, casi el 50% de estos pacientes tienen mutaciones del gen MEK1.

Tabla 1. Tabla que resume las principales características epidemiológicas, clínicas, analíticas y genéticas de la tricoleucemia (TL) y las principales entidades a tener en cuenta en el diagnóstico diferencial

	TLc (clásica)	TL variante	LEZM	LEDPR
Frecuencia	0,3/100.00	0,3/100.00	0,13/100.00	n/a
Ratio M:F	4:1	1-2:1	1:3	1-2:1
Edad mediana (años)	50-55	> 70	65-70	65-75
Linfocitosis	≤ 10%	≥ 90%	≥ 50%	≥ 50%
Inmunofenotipo	CD11c+ CD103+ CD25+ CD200+ CD23– CD5–	CD11c+ CD103± CD25– CD200– CD23– CD5–	CD11c– CD103± CD25± CD200+ CD23± CD5±	CD11c+ CD103– CD25± CD23– CD5±
Inmunohistoquímica	DBA.44+ Ciclina D1+ Anexina 1+	DBA.44+ Ciclina D1± Anexina 1–	DBA.44+ Ciclina D1– Anexina 1–	DBA.44+ Ciclina D1– Anexina 1–
Genotipo	Mutación BRAF V600E	BRAF no mutado MEK mutado 50% Reordenamiento IGV4-34 50%	BRAF no mutado	BRAF no mutado

Adaptada y traducida de T. Roider, F1000Res. 2018[10]
LEDPR: linfoma esplénico difuso de la pulpa roja; LEZM: linfoma esplénico de la zona marginal

La TLv se considera actualmente una entidad independiente de la TLc por la OMS, junto con otros SLPC-B como el linfoma esplénico de la zona marginal (LEZM) y el linfoma esplénico difuso de la pulpa roja (LEDPR), y es imprescindible hacer el diagnóstico diferencial entre todas estas entidades[10], cuyas características principales se resumen en la Tabla 1.

Otra variante biológica a tener en cuenta es la TL con genes IGHV mínimamente reordenados o con **reordenamiento IGHV4:34**, que puede corresponder inmunofenotípicamente tanto a TLc (10% de las TLc) como a TLv (40-50%), pero **en ningún caso presenta la mutación BRAF V600E**, responde mal a análogos de purina y su pronóstico es adverso.

› Manejo terapéutico de la tricoleucemia

El hecho de ser una enfermedad indolente y de evolución lenta permite que algunos pacientes (en torno al 10%) no presenten síntomas de la enfermedad al diagnóstico, incluso en casos con citopenias moderadas, pudiendo permanecer asintomáticos durante largos periodos de tiempo. Estos pacientes pueden vigilarse sin tratamiento mientras no presenten indicios de progresión, ya que observarlos no ha demostrado desventaja a largo plazo y el tratamiento estándar basado en análogos de purina se asocia a inmunosupresión que puede ser prolongada, por lo que la necesidad de tratamiento debe quedar bien establecida[11,14].

La TL debe tratarse cuando hay síntomas de la enfermedad o el descenso de las cifras hematológicas indica una infiltración tumoral severa. Según el consenso del HCLF[11] y otros grupos de expertos, se recomienda esperar a la aparición de **al menos uno de los siguientes criterios de tratamiento**, aplicables tanto a la TLc como a la TLv:

- Analíticos: hemoglobina (Hb) < 100-110 g/L, recuento de plaquetas < 100 × 10^9/L o de neutrófilos absolutos < 1 × 10^9/L. Un criterio adicional es la presencia de > 5 × 10^9/L de linfocitos **clonales** en SP.
- Clínicos: esplenomegalia masiva y/o sintomática, crecimiento de adenopatías o complicaciones infecciosas recurrentes u oportunistas, u otros síntomas generales asociados a la progresión de la enfermedad.

› Tratamiento de primera línea

Desde su aparición en los años ochenta, los **análogos de purina pentostatina y cladribina** cambiaron de forma drástica el pronóstico de la TL, prolongando la supervivencia de estos pacientes de 3-4 años con los tratamientos anteriores a los más de 15 años de mediana actuales.

El National Cancer Institute (NCI) demostró superioridad de la pentostatina sobre interferón alfa (IFN-α) en un estudio aleatorizado en 313 pacientes, tanto en eficacia, con RG y respuestas completas (RC) del 79 y el 76% con pentostatina *versus* 38 y 11% con IFN-α, como en SG[15]. Sin embargo, pentostatina y cladribina no se han comparado nunca en ensayos aleatorizados, aunque los numerosos estudios retrospectivos publicados sugieren que son comparables. En 233 pacientes con TL tratados con pentostatina (188/233) y cladribina (45/233) analizados retrospectivamente en el Royal Marsden Hospital de Londres con un seguimiento mediana de 16 años, las tasas de RG/RC fueron del 96/82% y del 100/76%, respectivamente, sin diferencias significativas, y la supervivencia libre de recaídas (SLR) fue de 9 años para toda la cohorte[16]. Estos datos de eficacia se han confirmado por otros grupos de todo el mundo, con tiempos libres de enfermedad y de tratamientos posteriores de más de 10 años, consolidándose así los dos análogos de purina como la elección en primera línea.

La pentostatina se administra por vía intravenosa bisemanalmente durante 3-6 meses hasta alcanzar respuesta clínica, mientras que la cladribina se puede administrar por vía intravenosa o subcutánea (esta última es más cómoda y coste-efectiva), a dosis fija durante 5-7 días consecutivos. Se han ensayado varias pautas de cladribina y todas son efectivas. Desde el punto de vista del perfil de toxicidad, la cladribina es más inmunosupresora y sus efectos más prolongados que con pentostatina, de forma que la primera no puede usarse en pacientes con infección activa, mientras que hay estudios que demuestran que el tratamiento con pentostatina a dosis bajas se puede hacer de forma eficaz y segura incluso en pacientes con infección activa. De todos modos, en casos de infección activa, la recomendación es controlarla antes de iniciar tratamiento con análogos de purina, pero esta es de hecho una de las situaciones más complejas en el manejo de estos pacientes.

Con todo, la elección de pentostatina o cladribina se establece en función de la experiencia de cada grupo, del esquema más conveniente o de características individuales del paciente que podrían hacerlo más vulnerable a toxicidades concretas de cada fármaco.

› *Criterios de la respuesta y evaluación de la enfermedad mínima residual (EMR)*

La evaluación de la respuesta es una parte fundamental del manejo del paciente y tiene impacto pronóstico, ya que los pacientes que alcanzan RC son los que tienen supervivencias libres de enfermedad (SLE) más prolongadas. Tiene también implicaciones de manejo, ya que permite guiar las decisiones de tratamiento, la duración del mismo y el seguimiento posterior.

Para evaluar la respuesta es necesario repetir todas las exploraciones que al diagnóstico nos permitieron detectar la enfermedad y valorar su extensión. La exploración física completa y los estudios de laboratorio, hemograma y frotis de SP son imprescindibles para valorar la mejoría o la desaparición de los signos y síntomas presentes antes del tratamiento; y el uso de técnicas radiológicas (TAC, ecografía, etc.) para la valoración de organomegalias seguirá en cada caso los mismos criterios que se aplicaron al diagnóstico. La realización de **BMO tras el tratamiento** es opcional en la práctica, pero es **imprescindible para acreditar una RC**, ya que es la única prueba que permite comprobar el restablecimiento de la hematopoyesis y la erradicación de enfermedad en la MO.

Con el uso de análogos de purinas, la recuperación de la hematopoyesis puede ser lenta y la mejoría ir apareciendo progresivamente, por lo que en el caso de la cladribina no se recomienda realizar la BMO de revaluación hasta pasados 4-6 meses del tratamiento. Con respecto a la pentostatina, la evaluación con BMO debe hacerse cuando se normalicen las cifras hematológicas, tras lo que frecuentemente se añaden 2 ciclos más de consolidación si se confirma la respuesta.

Los criterios que definen la **RC, respuesta parcial (RP), enfermedad estable (EE), enfermedad progresiva (EP) y TL en recaída** se resumen en la Tabla 2.

La EMR se define en las guías actuales[11] como el porcentaje de células tumorales detectable **por técnicas de IHQ** (no por las tinciones convencionales para valorar la morfología) en la BMO, con marcadores como CD20 o DBA.44, aunque tras el tratamiento con rituximab pueden ser útiles otros marcadores B (CD79a) y/o marcadores específicos de TL como VE1. La evaluación de la EMR postratamiento permite diferenciar distintos grupos en función de su riesgo de recaída, de menor a mayor riesgo: grupo I con < 1% de células detectables, grupo II con 1-5% de EMR y grupo III con > 5% de células positivas por IHQ, aunque estos grupos predictivos aún requieren validación en estudios futuros. Actualmente, no se requieren técnicas como la citometría de flujo o moleculares para la detección de EMR en la TL.

Tabla 2. Criterios de respuesta tras el tratamiento según las recomendaciones de consenso de la Hairy Cell Leukemia Foundation (HCLF)

Criterios de respuesta
Respuesta completa (RC) Normalización de las cifras hematológicas: Hb > 110 g/L (sin transfusión), plaquetas > 100 × 10^9/L, neutrófilos absolutos > 1,5 × 10^9/L Regresión de la esplenomegalia a la exploración, ausencia de evidencia de enfermedad morfológica en SP y MO
RC con o sin enfermedad mínima residual (EMR) En pacientes que alcanzan RC, una evaluación inmunohistoquímica del porcentaje de EMR permitirá separar los pacientes entre RC con o sin evidencia de EMR
Respuesta parcial (RP) Mejoría de los recuentos hematológicos (como en la RC) con un mínimo del 50% de reducción de las organomegalias y de la infiltración medular en la BMO
Enfermedad estable (EE) Se considera EE cuando no se alcancen criterios de respuesta objetiva tras el tratamiento Como la indicación de tratamiento en la TL se hace en función de síntomas de la enfermedad y/o disminución de las cifras hematológicas, **la EE no se considera una respuesta aceptable**
Enfermedad progresiva (EP) Son criterios de progresión el empeoramiento de los síntomas de enfermedad un 25% de aumento de las organomegalias o un 25% de disminución de las cifras hematológicas Es crucial diferenciar el descenso en las cifras hematológicas debido a la infiltración medular por la enfermedad del efecto mielosupresor de los tratamientos (solo el primero se considera progresión)
TL en recaída La recaída morfológica se define por la reaparición de TL en el frotis de SP, BMO o ambos en ausencia de recaída hematológica La recaída hematológica se define por la reaparición de citopenia(s) por debajo de los límites de RC y RP Mientras que la recaída morfológica no requiere tratamiento, la decisión de retratamiento de la recaída hematológica se basa en varios parámetros (cifras hematológicas que cumplan criterios de tratamiento, reaparición de síntomas de la enfermedad)

Adaptada y traducida de M.R. Grever, Blood. 2017[11]
BMO: biopsia de médula ósea; Hb: hemoglobina; MO: médula ósea; SP: sangre periférica; TL: tricoleucemia

› *Tratamiento en recaída o refractariedad*

A pesar de la gran eficacia y la duración de las respuestas tras el tratamiento con análogos de purina, la TL sigue siendo una enfermedad incurable y muchos pacientes recaen. No obstante, que reaparezcan signos de enfermedad, que no llegue a alcanzarse RC o que haya EMR detectable no suponen una indicación de retratamiento si no se acompañan de síntomas o de alguno de los criterios de tratamiento descritos para el tratamiento de primera línea. Sin embargo, la EE supone una ausencia de respuesta y, dado que para iniciar tratamiento deben cumplirse unos criterios que indican la necesidad del mismo, no es una respuesta aceptable en la TL y requiere retratamiento de forma similar a la progresión o la recaída.

Si se confirma la necesidad de rescate o no hay una respuesta aceptable al tratamiento de primera línea, la HCLF recomienda en primer lugar **confirmar el diagnóstico inicial y el tratamiento recibido en inducción**[11], así como la presencia de factores de mal pronóstico que expliquen la menor eficacia y/o duración de la respuesta a los análogos de purina. Estos **factores de mal pronóstico** son la anemia severa o la esplenomegalia masiva (> 10 cm por debajo del reborde costal) sugestivos de mayor carga tumoral, un inmunofenotipo atípico que indique TLv o factores biológicos y genéticos como la detección de genes IGHV no mutados o con reordenamiento IGHV4-34, las mutaciones de TP53 o la ausencia de mutación BRAF V600E.

El tiempo transcurrido hasta la recidiva también tiene relevancia pronóstica y en la toma de decisiones de manejo, ya que las recaídas muy tardías (> 60 meses) pueden manejarse con el mismo tratamiento recibido en la primera línea, mientras que en recaídas precoces (en los primeros 24 meses tras la respuesta anterior) es recomendable considerar otras opciones. Entre los 24 y los 60 meses, la HCLF propone retratar con análogos de purina en monoterapia o considerar su combinación con rituximab. En general, la primera remisión es más duradera y se asocia a mayor tasa de RC que en sucesivos episodios de la enfermedad.

› *Opciones de tratamiento en recaída y refractariedad*

El **retratamiento con análogos de purina** en pacientes que recaen es posible en la TL y además se alcanzan tasas de RC del 68% en segunda línea y del 47% en tercera línea, si bien tanto la eficacia como la duración de las respuestas van disminuyendo con las sucesivas líneas[16], haciendo necesario considerar otras opciones.

Entre las alternativas al retratamiento con análogos de purina, **rituximab** se evaluó con muy buenas expectativas inicialmente como estrategia dirigida contra una diana celular, dada la intensa expresión de CD20 en los tricoleucocitos. Sin embargo, administrado **en monoterapia** en 24 pacientes en recaída tras cladribina, solo se obtuvieron respuestas modestas (hasta 18 pacientes no respondieron y, del 26% que respondió, solo la mitad alcanzaron RC) y de corta duración[17]. Los resultados de este y otros estudios hicieron, por tanto, que el uso de rituximab en monoterapia solo se considere una alternativa en casos sin otras opciones disponibles, de forma similar al posible uso actual de tratamientos "clásicos" como el IFN-α o la esplenectomía.

La **combinación de rituximab con cladribina o pentostatina**, sin embargo, sí demostró eficacia en recaída y en pacientes con respuestas insuficientes a análogos de purina en monoterapia. En un análisis retrospectivo de 18 pacientes en recaída tras 1-6 tratamientos previos y respuestas desfavorables a las líneas iniciales (solo 9 tuvieron RC en inducción y también la mitad recayeron precozmente), tratados con rituximab-pentostatina (12/18) o rituximab-cladribina (6/18), se observaron respuestas en todos los pacientes, con RC del 89% y EMR indetectable en los 13 que se evaluaron. A los 36 meses de seguimiento, los 16 pacientes que habían alcanzado RC seguían sin enfermedad, con una tasa estimada de recurrencia a los 3 años del 7%[18]. Estos resultados fueron superiores a los alcanzados en los mismos pacientes en líneas anteriores con los análogos en monoterapia.

La combinación **rituximab-cladribina (CDAR)** también se evaluó prospectivamente por el grupo del MD Anderson Cancer Center (MDACC) en un fase II que incluyó pacientes con TLc en recaída (n = 14) y en primera línea (n = 59) así como TLv (n = 7)[19]. Las tasas de RC fueron del 100, el 100 y el 86%, respectivamente, con un 94% de los pacientes sin EMR detectable y con SLR estimada a 5 años del 100, el 95 y el 64%, respectivamente, a los 60 meses de seguimiento. En todos los casos, la duración de las respuestas con rituximab-cladribina superó a la obtenida con cladribina en monoterapia en los mismos pacientes en líneas previas.

El estudio anterior, que incluyó 7 casos de TLv (que responden habitualmente peor a los análogos en monoterapia que la TLc y tienen supervivencias más cortas), demostró que estos pacientes responden mejor a la combinación con rituximab, por la sinergia entre ambos agentes. Esta mayor eficacia de la combinación se confirmó en un estudio prospectivo del NCI en 10 pacientes con TLv no tratados o en recaída tras una línea previa con cladribina[20], que alcanzaron RC en 9/10, quedando 8 de ellos sin EMR detectable a los 27 meses de seguimiento y sin que la combinación tuviera una toxicidad limitante. Con estos y otros estudios, **la recomendación actual en pacientes con TLv es el uso de análogos de purina siempre en combinación con rituximab, incluso en primera línea**.

Entre las opciones de inmunoquimioterapia convencional eficaces en TL, **rituximab-bendamustina** también se evaluó prospectivamente en un estudio que aleatorizó a 12 pacientes en recaída tras 2 o más líneas a recibir 2 dosis de bendamustina: 70 y 90 mg/m^2, combinadas con rituximab[21]. Todos los pacientes respondieron, 7 (58%) con RC, y sin observarse toxicidad limitante con ninguna de las 2 dosis. R-bendamustina es una opción eficaz en TL, a considerar en pacientes que fracasan al tratamiento estándar y en los que se buscan RC y duraderas.

Más recientemente han aparecido nuevas opciones de tratamiento basadas en agentes biológicos con actividad en la TL, gracias a los grandes avances habidos en el conocimiento de su patogenia. El importante descubrimiento de la mutación BRAF V600E y su papel en la biología de la TL ha permitido que se evaluase en estos pacientes el **inhibidor de BRAF vemurafenib**, que ya estaba aprobado en melanoma desde 2011. Los 2 ensayos más importantes que evalúan vemurafenib en la TL (en Italia y los EE.UU. simultáneamente) demostraron un potente efecto antitumoral en TL con mutación BRAF V600E en recaída y refractarios a tratamiento estándar[22]. El estudio italiano evaluó 28 pacientes que alcanzaron respuestas globales del 96% con RC del 35%. A los 23 meses de seguimiento, los pacientes que alcanzaron RC tuvieron una SLR de 19 meses y supervivencia libre de nuevo tratamiento (SLT) de 25 meses, mientras que en los que alcanzaron solo RP, las SLR y SLT fueron de 6 y 18 meses, res-

pectivamente. En el estudio americano se incluyeron 26 pacientes con las mismas características que en el italiano y las tasas de RG y RC fueron del 100 y el 42%, respectivamente, con SLP del 73% y SG del 91% a los 11,5 meses de seguimiento en el momento de la publicación de los resultados. Vemurafenib se administró por vía oral a 960 mg 2 veces al día de forma continua en ciclos de 28 días, hasta 16 semanas en Italia y hasta 18 en los EE.UU. La toxicidad más frecuente, de grados 1-2, fue *rash*, artralgias/artritis y la aparición de tumores cutáneos en 7 de los 50 pacientes.

A pesar de esta gran actividad, se observan recaídas al acabar el tratamiento y la duración de las respuestas es limitada, sobre todo en pacientes que no alcanzan RC. Sin embargo, los pacientes pueden retratase con éxito, recuperando la respuesta. Se han evaluado dosis más bajas de vemurafenib para atenuar la toxicidad, tanto en inducción como en mantenimiento para prolongar la respuesta alcanzada[10]. También se han descrito en estudios de secuenciación masiva mutaciones adicionales que podrían interaccionar con la BRAF V600E, reduciendo la sensibilidad de la célula tumoral al vemurafenib.

La eficacia del bloqueo de BRAF V600E ha demostrado ser una vía eficaz de tratamiento de la TL y ya está en evaluación a nivel internacional un **nuevo inhibidor de BRAF, dabrafenib**, así como **combinaciones de inhibidores de BRAF con otros agentes** para tratar de mejorar la calidad y la duración de las respuestas. En pacientes con TL resistente a vemurafenib se están investigando otras estrategias, como los **inhibidores de MEK (trametinib, selumetinib,** cobimetinib), que han demostrado respuestas eficaces con resolución de las citopenias y restauración de la hematopoyesis en monoterapia[23], la **combinación de ambos inhibidores (MEK y BRAF)** y también la asociación de **vemurafenib con anti-CD20**: con rituximab se han observado RG de casi el 100% con un tercio de RC y con obinutuzumab está en investigación actualmente.

Por último, hay otros agentes biológicos con actividad en pacientes con TL en recaída y refractarios. **Moxetumomab pasudotox** es una inmunotoxina conjugada con un anticuerpo monoclonal anti-CD22 que demostró RG del 88% y RC del 57% en estudios de fase I/II y está ya **aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para TL** en recaída o refractaria tras 2 o más líneas de tratamiento previas que incluyan análogos de purina en alguna de ellas. El inhibidor de BTK **ibrutinib**, aprobado ya en otras indicaciones en oncohematología (leucemia linfocítica crónica –LLC–, linfoma del manto, Waldenström, linfoma de la zona marginal, entre otros), está también en evaluación en pacientes con TL, con un especial interés en pacientes con TLv, para los que ni los análogos de purina ni los nuevos inhibidores de BRAF son una opción óptima.

› Conclusiones y consideraciones finales

La TL es una enfermedad de curso indolente y, en la práctica, la mayoría de los pacientes llegan a convivir con ella de forma similar a otros tipos de SLPC. Sin embargo, muchos de ellos recaen y en los sucesivos episodios el manejo se va haciendo más difícil y las expectativas más desfavorables.

La baja incidencia de esta enfermedad y algunas de sus peculiaridades biológicas han dificultado la puesta en marcha de ensayos clínicos bien controlados y, de hecho, las guías actuales de consenso siguen basándose sobre todo en recomendaciones de expertos. Estas dificultades hacen que los avances habidos en esta enfermedad tengan un valor adicional. El primer hito en el manejo de la TL fue la aparición de los análogos de purinas, que requirió más de 20 años desde la primera descripción de la enfermedad, pero supuso un aumento en la supervivencia de estos pacientes de 4 a los más de 10 años de mediana actuales.

El segundo gran salto cualitativo en la historia de la TL ha sido el descubrimiento de la mutación BRAF V600E en 2011 (aproximadamente 30 años más tarde), que ha revolucionado el conocimiento de la biología y la patogenia de la enfermedad, y ha permitido desarrollar agentes dirigidos a dianas celulares cruciales para la supervivencia del tumor que ya permiten vislumbrar un panorama mucho más prometedor, en especial para pacientes menos sensibles a los análogos de purina (TLv, TL con reordenamiento IGHV4:34 o TLc en sucesivas recaídas), pero seguramente también en primera línea, con lo que sin duda estaremos avanzando un poco más hacia una posible curación de esta enfermedad.

› Bibliografía

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Vol. 2. Revised 4th edition. WHO/IARC; 2017.

2. Gosselin GR, Hanlon DG, Pease GL. Leukaemic reticuloendotheliosis. Can Med Assoc J. 1956;74(11):886-91.
3. Bouroncle BA, Wiseman BK, Doan CA. Leukemic reticuloendotheliosis. Blood. 1958;13(7):609-30.
4. Teras LR, DeSantis C, Cerhan JR, Morton LM, Jemal A, Flowers CR. 2016 US Lymphoid Malignancy Statistics by World Health Organization Subtypes. CA Cancer J Clin. 2016;66:443-59.
5. Habermann TM, Rai K. Historical treatments of in hairy cell leukemia, splenectomy and interferon: past and current uses. Leuk Lymphoma. 2011;52 Suppl 2:18-20.
6. Goodman GR, Burian C, Koziol JA, Saven A. Extended follow-up of patients with hairy cell leukemia after treatment with cladribine. J Clin Oncol. 2003 Mar 1;21(5):891-6.
7. Jehn U, Bartl R, Dietzfelbinger H, Haferlach T, Heinemann V. An update: 12-year follow-up of patients with hairy cell leukemia following treatment with 2-chlorodeoxyadenosine. Leukemia. 2004;18:1476-81.
8. Kreitman RJ, Arons E. Update on Hairy Cell Leukemia. Clin Adv Hematol Oncol. 2018;16(3):205-15.
9. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. N Engl J Med. 2011;364(24):2305-15.
10. Roider T, Falini B, Dietrich S. Recent advances in understanding and managing hairy cell leukemia. F1000Res. 2018 Apr 27;7.
11. Grever MR, Abdel-Wahab O, Andritsos LA, Banerji V, Barrientos J, Blachly JS, et al. Consensus guidelines for the diagnosis and management of patients with classic hairy cell leukemia. Blood. 2017;129(5):553-60.
12. Sherman MJ, Hanson CA, Hoyer JD. An assessment of the usefulness of immunohistochemical stains in the diagnosis of hairy cell leukemia. Am J Clin Pathol. 2011;136(3):390-9.
13. Tiacci E, Schiavoni G, Forconi F, Santi A, Trentin L, Ambrosetti A, et al. Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation. Blood. 2012;119(1):192-5.
14. Golomb HM. Hairy cell leukemia: lessons learned in twenty-five years. J Clin Oncol. 1983;1(10):652-6.
15. Grever M, Kopecky K, Foucar MK, Head D, Bennett JM, Hutchison RE, et al. Randomized comparison of pentostatin versus interferon alfa-2a in previously untreated patients with hairy cell leukemia: an intergroup study. J Clin Oncol. 1995;13(4):974-82.
16. Else M, Dearden CE, Matutes E, García-Talavera J, Rohatiner AZ, Johnson SA, et al. Long-term follow-up of 233 patients with hairy cell leukaemia, treated initially with pentostatin or cladribine, at a median of 16 years from diagnosis. Br J Haematol. 2009;145(6):733-40.
17. Nieva J, Bethel K, Saven A. Phase 2 study of rituximab in the treatment of cladribine-failed patients with hairy cell leukemia. Blood. 2003;102(3):810-3.
18. Else M, Dearden CE, Matutes E, Forconi F, Lauria F, Ahmad H, et al. Rituximab with pentostatin or cladribine: an effective combination treatment for hairy cell leukemia after disease recurrence. Leuk Lymphoma. 2011 Jun;52 Suppl 2:75-8.
19. Chihara D, Kantarijan, O'Brien S, Jorgensen J, Pierce S, Faderl S, et al. Long-term durable remission by cladribine followed by rituximab in patients with hairy cell leukemia: update of a phase II trial. Br J Haematol. 2016 Sep;174(5):760-6.
20. Kreitman RJ, Wilson W, Calvo KR, Arons E, Roth L, Sapolsky J, et al. Cladribine with immediate rituximab for the treatment of patients with Variant Haiary Cell Leukemia. Clin Cancer Res. 2013;19(24):6873-81.
21. Burotto M, Stetler-Stevenson M, Arons E, Zhou H, Wilson W, Kreitman RJ. Bendamustine and rituximab in relapsed and refractory hairy cell leukemia. Clin Cancer Res. 2013;19(22):6313-21.
22. Tiacci E, Park JH, De Carolis L, Chung SS, Broccoli A, Scott S, et al. Targeting mutant BRAF in relapsed or refractory Hairy-Cell Leukemia. N Engl J Med. 2015 Oct 29;373(18):1733-47.
23. Caeser R, Collord G, Yao WQ, Yao WQ, Chen Z, Vassiliou GS, et al. Targeting MEK in vemurafenib-resistant hairy cell leukemia. Leukemia. 2019 Feb;33(2):541-5.

› Conflictos de intereses

Ana Marín-Niebla ha participado como ponente en reuniones científicas y talleres organizados por las empresas farmacéuticas Janssen España, Janssen Portugal, Janssen Egypt, Janssen LatAm, Roche Pharma, Roche Diagnostics, Celgene y Takeda; como docente en programas de formación continuada y educación médica para profesionales médico-sanitarios y para personal de la industria farmacéutica (Roche Pharma, Janssen, Bayer, Celgene, Amgen, Abbie, Kiowa Kirin); y como invitada en comités de opinión de expertos (*advisory boards*) nacionales e internacionales organizados por las empresas Janssen, Takeda, Roche, Celgene y Kiowa Kirin.

Elisa Roldán no tiene conflictos de interés que declarar.

ACTUALIZACIÓN EN MEDICINA TRANSFUSIONAL

Coordinadores: **Dr. José Luis Arroyo Rodríguez.** Banco de Sangre y Tejidos de Cantabria
Dra. Cristina Arbona Castaño. Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana

El desarrollo de un simposio de medicina transfusional en este congreso nos brinda la oportunidad de revisar algunos temas de actualidad, independientemente del área de trabajo. Todos ellos se refieren a aspectos eminentemente prácticos del ámbito transfusional.

1. El empleo de anticuerpos monoclonales para el tratamiento de diferentes hemopatías es creciente. Buen ejemplo de ello, el anticuerpo anti-CD38 (daratumumab), utilizado fundamentalmente en el contexto del MM refractario. Ya desde los ensayos clínicos previos a la autorización, anti-CD38 mostró reactividad cruzada con los hematíes (la glicoproteína CD38 se encuentra débilmente expresada en la membrana eritrocitaria), interfiriendo en las pruebas pretransfusionales, y haciendo, por tanto, inviable la transfusión de hematíes con prueba cruzada negativa.

En su intervención, la **Dra. Olga López** (responsable del Servicio de transfusión del Complejo Universitario de Salamanca) hará una exhaustiva exposición sobre este tema y nos dará las claves para interpretar adecuadamente los hallazgos de laboratorio en estos casos y, fundamentalmente, para abordar de forma práctica la resolución de este problema.

2. Los concentrados de plaquetas (CP) constituyen un hemoderivado imprescindible para el tratamiento o soporte adecuado de numerosos pacientes. En España se realizan al año más de 200.000 transfusiones de plaquetas (Informe estatal de HV 2007). Si bien, la indicación de transfusión de plaquetas está bastante bien establecida en el contexto del paciente hematológico que recibe quimioterapia o ha sido sometido a un trasplante de PH, existen todavía muchas otras situaciones clínicas, más frecuentes, en las que los criterios no están bien definidos o hay controversia. Le hemos pedido al **Dr. J. Anguita** una revisión fundamentada en el grado de evidencia disponible precisamente para esas situaciones. Como responsable del servicio de transfusión de un gran hospital terciario, dispone de una amplísima experiencia y conocimiento en el campo. Sin duda alguna, su exposición incluirá recomendaciones precisas y prácticas para la indicación y uso de este componente sanguíneo de disponibilidad limitada.

3. En el ámbito sanitario, los centros y servicios de transfusión han sido pioneros en la implementación y desarrollo de sistemas de gestión de calidad. El Programa de Acreditación en Transfusión Sanguínea –CAT (su origen se remonta a 1973 como PABAS) ha sido, sin duda alguna, uno de los principales promotores. La certificación CAT se basa en el cumplimiento de los requisitos (técnicos y de calidad) recogidos en los estándares que llevan su nombre y que son revisados y actualizados periódicamente por el comité técnico de la Fundación CAT.

Recientemente ha sido publicada su última actualización (5.ª ed). En su redacción definitiva se ha tenido especialmente en cuenta las Directrices de Buenas Prácticas (*Guía para la Preparación, Uso y Garantía de calidad para los componentes sanguíneos*-Consejo de Europa). El cambio de título, la ampliación de alcances certificables, la gestión del riesgo, el control de cambios o los requisitos exigidos para la validación de procesos son algunas de las novedades más significativas de esta edición. **El Dr. García Gala**, director técnico de la Fundación CAT, hará una detallada exposición de todas ellas.

Pruebas pretransfusionales en paciente tratado con anti-CD38

Olga López Villar
Servicio de Transfusión, Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario de Salamanca

› Introducción

En los últimos años el tratamiento de diversas hemopatías malignas incluye el empleo de anticuerpos monoclonales. Cada vez son más numerosos y cada vez se aplican a mayor número de enfermedades. Los regímenes de tratamiento más habituales en los linfomas no Hodgkin incluyen el anticuerpo anti-CD20, que se ha incorporado también al arsenal terapéutico de diversas enfermedades de base inmune. Anti-CD52 y anti-CD30 también cada vez se emplean más en diferentes enfermedades, incluyendo neoplasias hematológicas.

Los anticuerpos monoclonales han tardado algún año más en asentarse como parte del tratamiento del mieloma múltiple. En el tratamiento de esta enfermedad irrumpió con fuerza el anticuerpo monoclonal anti-CD38. Daratumumab se encuentra en fase más avanzada que isatuximab. Si bien el primer paciente que fue tratado con daratumumab lo recibió en 2008, el tratamiento con este fármaco se extendió, tras varios ensayos clínicos, en enero de 2017, tras su aprobación en monoterapia en pacientes en recaída y refractarios, y principalmente desde abril de 2018, cuando se aprobó en combinación con dexametasona y bortezomib o lenalidomida como tratamiento de segunda línea.

Anti-CD38 es un anticuerpo monoclonal IgG1κ que se une a CD38, glicoproteína transmembrana de cadena única que se expresa en altos niveles en las células plasmáticas tanto normales como patológicas. Si bien hay diferencias en el mecanismo de acción, de manera general se puede decir que anti-CD38 causa apoptosis por diferentes mecanismos: citotoxicidad, fagocitosis, inmunomodulación, etc.

CD38 no solo se expresa en la superficie de las células plasmáticas, sino que también se expresa en hematíes, plaquetas, linfocitos T y B, células progenitoras hematopoyéticas, nervios periféricos, islotes pancreáticos, entre otros. El uso más extendido de este anticuerpo monoclonal es en el mieloma múltiple y otras discrasias de células plasmáticas, pero también se encuentra en ensayos clínicos en diferentes linfomas y en síndromes mielodisplásicos.

Uno de los eventos secundarios al tratamiento con anti-CD38 que más ha llamado la atención es la interferencia con las pruebas pretransfusionales, detectada ya desde los ensayos clínicos previos a la autorización.

› Interferencia con las pruebas pretransfusionales

Desde los primeros ensayos se sigue, con cierta preocupación, la aparición de ciertos resultados que dificultan las pruebas pretransfusionales en los pacientes tratados con anti-CD38. Inicialmente no se sabía si la interferencia se debía al CD38 expresado de forma débil en los hematíes o a alguna propiedad adicional del fármaco que, recordemos, es de tipo IgG. Posteriormente, se describió que, si bien CD38 se expresa de forma débil en los hematíes, es suficiente para causar las interferencias.

Se describe un escrutinio de anticuerpos irregulares positivo, panaglutinación en los paneles de identificación y prueba cruzada positiva en fase de antiglobulina. En resumen, un "falso positivo" en las pruebas que conlleven adición de reactivo de antiglobulina. Conviene destacar que el test de Coombs directo suele ser negativo, hecho llamativo si asociamos la reactividad del fármaco a la expresión de CD38, que lógicamente también se expresa en los hematíes del paciente adulto. No se observan interferencias en la determinación del grupo ABO/Rh(D) y tampoco en el fenotipo eritrocitario extenso.

Esta "panaglutinina" se detecta ya se realice la técnica de antiglobulina indirecta en tubo, en tarjeta de microcolumna o en microplaca. También aparece empleando tanto hematíes resuspendidos en soluciones de baja fuerza iónica como en hematíes resus-

pendidos en salino. Con las técnicas de adsorción habituales en los servicios de transfusión no se consigue eliminar este anticuerpo.

Esta interferencia es muy precoz, se detecta tras la administración de la primera dosis. Otro hecho singular, teniendo en cuenta que la semivida estimada del fármaco es de 22-23 días, es que se ha descrito la persistencia hasta 6 meses después de haber recibido la última dosis.

La seguridad del paciente puede verse comprometida en caso de precisar transfusión y estar recibiendo, o haber recibido, tratamiento con anti-CD38, si no se ha previsto el caso con anterioridad con el Servicio de Transfusión.

› Métodos

En los últimos años se han ensayado diferentes métodos para tratar de disminuir esta interferencia. Cada técnica presenta una serie de ventajas y de inconvenientes, pudiendo concluir que, posiblemente, el método óptimo aún no se haya desarrollado, teniendo que habilitar la mejor estrategia en cada centro en función de sus posibilidades:

• Fenotipo extendido: en la mayoría de los servicios de transfusión puede realizarse un fenotipo extendido de los hematíes del paciente. En ausencia de test de Coombs directo positivo, pueden tiparse incluso aquellos que requieren fase de antiglobulina para su detección. Los pacientes podrían recibir concentrados de hematíes negativos para los antígenos para los que también es negativo el paciente. Esta técnica no elimina la reactividad asociada a anti-CD38.

• Genotipo eritrocitario: su finalidad es la misma que la del fenotipo. Puede realizarse, en centros especializados, en aquellos pacientes con transfusiones recientes. Tampoco elimina la reactividad por anti-CD38.

• Escrutinio de anticuerpos irregulares con hematíes de cordón umbilical. Los hematíes de cordón expresan de forma muy baja o nula CD38 en su superficie. El inconveniente es que no expresan algunos antígenos, no están disponibles en todos los servicios de transfusión y, obviamente, no están disponibles para prueba cruzada.

• No se ha detectado esta interferencia en hematíes tratados con enzimas. La limitación más evidente es que no se detectarían anticuerpos contra antígenos de los sistemas Duffy, MNSs, etc.

• La tripsina y el ditiotreitol (DTT) son 2 reactivos que se han empleado porque desnaturalizan la proteína CD38 de la superficie de los hematíes. La tripsina es económica. El DTT es más efectivo y se ha acabado imponiendo. El hecho de tener que ajustar el pH para preparar el DTT y el mantenimiento de los hematíes tratados con este reactivo sigue siendo un reto. Además, estos reactivos desnaturalizan otros antígenos, entre los que destaca la desaparición de los antígenos del sistema Kel, que son de especial relevancia clínica, tras el tratamiento de los hematíes con DTT, por lo que hay que seleccionar hematíes K negativo. Recientemente se ha comercializado un agente para neutralizar el CD38 en la superficie de los hematíes que no desnaturaliza las proteínas.

• Para neutralizar el anticuerpo en el plasma se podría emplear los anticuerpos anti-idiotipo y la proteína CD38 soluble, si bien no están disponibles comercialmente.

› Interacción Unidad Clínica-Servicio de Transfusión

La comunicación entre las unidades clínicas y el Servicio de Transfusión es fundamental para la seguridad de los pacientes. Esto es especialmente evidente en los pacientes que van a recibir o han recibido tratamiento con fármacos que interfieren en las pruebas de compatibilidad. Fármacos que llevan en uso más años que los anticuerpos monoclonales, como son las inmunoglobulinas polivalentes, también causan interferencia y ya requieren de una adecuada comunicación entre los servicios para evitar técnicas innecesarias y retraso en la transfusión.

En el caso del paciente que va a recibir anti-CD38, es fundamental que se solicite un estudio previo al inicio del fármaco. En esta muestra se estudiará el grupo ABO, Rh(D) y un fenotipo extendido, incluyendo los antígenos clínicamente significativos más frecuentes. También se realizará escrutinio y, si es positivo, identificación de anticuerpos irregulares, y test de Coombs directo.

Se recomienda entregar al paciente una tarjeta donde consten estos datos.

Si el paciente requiere una transfusión, las pruebas adicionales dependerán de la disponibilidad en el Servicio de Transfusión, del grado de urgencia, de los antecedentes del paciente, etc. Es recomendable te-

nerlo protocolizado. En cualquier caso, en el volante de solicitud debe constar que el paciente está recibiendo el fármaco para que el servicio lo prevea.

Aunque no se han descrito eventos adversos particulares por la transfusión en pacientes que estuvieran recibiendo anti-CD38, es recomendable realizar una vigilancia estrecha durante y después de la transfusión. Puede que los requerimientos transfusionales en pacientes afectos de mieloma múltiple no sean tan altos como en otras patologías, pero el hecho de que anti-CD38 se esté testando en ensayos clínicos en otras hemopatías, como el síndrome mielodisplásico, hace que apremie tener prevista la actitud con estos pacientes.

› Interferencia por otros anticuerpos monoclonales

Como hemos comentado, el tratamiento con anticuerpos monoclonales se encuentra en auge. Destaca el anti-CD47, que se encuentra en ensayos clínicos en linfoma no Hodgkin. CD47 se expresa de forma intensa en los hematíes y este fármaco causa interferencia en la determinación del grupo sérico, en el escrutinio y la identificación de anticuerpos irregulares, y en la prueba cruzada. También presentan autocontrol y test de Coombs directo positivo, detectando una panaglutinina al estudiar el eluido. En este caso, el DTT tampoco es útil, por lo que la comunicación entre la Unidad Clínica y el Servicio de Transfusión vuelve a ser primordial.

› Conclusiones

Las interferencias en las pruebas pretransfusionales por anti-CD38 son bien conocidas. Es necesario realizar al paciente un estudio basal antes del inicio del fármaco y conocer las herramientas para mitigar la interferencia una vez iniciado el tratamiento.

La interacción entre las unidades clínicas y el Servicio de Transfusión sigue siendo el eje principal para la seguridad de los pacientes.

› Bibliografía

- Chapuy CI, Aguad MD, Nicholson RT, AuBuchon JP, Cohn CS, Delaney M, et al. International validation of a dithiothreitol (DTT)-based method to resolve the daratumumab interference with blood compatibility testing. Transfusion. 2016;56(12):2964-72.
- Chapuy CI, Nicholson RT, Aguad MD, Chapuy B, Laubach JP, Richardson PG, et al. Resolving the daratumumab interference with blood compatibility testing. Transfusion. 2015;55(6 pt 2):1545-54.
- Dimopoulus MA, Oriol A, Nahi H, San-Miguel J, Bahlis NJ, Usmani SZ, et al. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. N Eng J Med. 2016; 375(14):1319-31.
- Lonial S, Weiss BM, Usmani SZ, Singhal S, Chari A, Bahlis NJ, et al. Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): an open-label, randomized, phase 2 trial. Lancet. 2016;387(10027):1551-60.
- Murphy MF, Dumont LJ, Greinacher A. Interference of new drugs with compatibility testing for blood transfusion. N Eng J Med. 2016;375(3):295-6.
- Oostendorp M, Lammerts van Bueren JJ, Doshi P, Khan I, Ahmandi T, Parren PW, et al. When blood transfusion medicine becomes complicated due to interference by monoclonal antibody therapy. Transfusion. 2015;55(6 pt 2):1555-62.
- Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, Nooka AK, Masszi T, Beksac M, et al. Daratumumab, Bortezomib and Dexamethasone for Multiple Myeloma. N Engl J Med. 2016;375(8):754-66.
- Plesner T, Krejcik J. Daratumumab for the treatment of multiple myeloma. Front Immunol. 2018;4(9):1228.
- Quach H, Benson S, Haysom H, Wilkes AM, Zacher N, Cole-Sinclair M, et al. Considerations for pre-transfusion immunohaematology testing in patients receiving the anti-CD38 monoclonal antibody daratumumab for the treatment of multiple myeloma. Intern Med J. 2018;48(2):210-20.
- Velliquette RW, Aeschlimann J, Kirkegaard J, Shakarian G, Lomas-Francia C, Westhoff CM. Monoclonal anti-CD47 interference in red cell and platelet testing. Transfusion. 2019;59(2):730-7.

Transfusión de plaquetas en situaciones especiales

Javier Anguita Velasco
Servicio de Transfusión, Servicio de Hematología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid
Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón

› Introducción

La transfusión de plaquetas se ha mostrado como una intervención clave en el tratamiento de soporte de los pacientes hematológicos sometidos a los tratamientos intensivos, los pacientes con insuficiencias medulares o de aquellos con algún tipo de disfunción plaquetaria.

Sin embargo, la evidencia científica que dirige la transfusión de este componente sanguíneo se limita a muy pocas situaciones, dejando en manos de las recomendaciones de expertos en forma de guías la mayoría de los diferentes escenarios en los que nos podemos encontrar la indicación de una transfusión de plaquetas[1].

En este trabajo se repasarán las principales indicaciones de la transfusión de plaquetas, valorando en cada caso el grado de evidencia existente. Dado que casi el 50% de las transfusiones de plaquetas de un hospital terciario se hace fuera del contexto del paciente hematológico (Tabla 1), se hará especial énfasis en las situaciones llamadas "especiales", entendiéndose por ellas las que se alejan más de la profilaxis del sangrado en el paciente hematológico sometido a tratamiento quimioterápico o a un trasplante hemopoyético.

Después de cada recomendación o indicación se anota entre paréntesis el grado de evidencia clínica basado en el sistema internacional de nomenclatura GRADE.

› Situaciones especiales

Actualmente, la transfusión de plaquetas debe adaptarse a cada situación clínica. De esta forma, la indicación en cada caso debe tener en cuenta el escenario clínico y la cifra de plaquetas.

En todo caso, si el origen de la trombocitopenia no está claro, se debe hacer un adecuado estudio diagnóstico antes de indicar la transfusión.

• **Transfusión de plaquetas como profilaxis de un sangrado cuando la trombocitopenia es reversible**[2]:

– **Profilaxis en tratamiento con quimioterapia (QT) y trasplante alogénico**: transfundir cuando las plaquetas bajan de 10×10^9/L (1B).

– **Trasplante autólogo sin sangrado y sin factores de riesgo –fiebre, antifúngicos, sangrado, leucemia mieloide aguda (LMA)-M3–:** no transfusión profiláctica (2B)[3].

– **Profilaxis en tratamiento con QT y trasplante alogénico con factores de riesgo (fiebre, antifúngicos, sangrado, LMA-M3)**: transfundir cuando las plaquetas bajan de 20×10^9/L (2C)[1].

La dosis que se debe emplear en todos estos escenarios debe ser una unidad terapéutica de adulto (*pool* o aféresis).

Tabla 1. Distribución por servicio de las transfusiones de unidades de plaquetas en un hospital de tercer nivel como el Hospital General Universitario Gregorio Marañón

Servicio	% de unidades transfundidas sobre el total
1. Hematología	36,8
2. Neonatología con UCI	12,6
3. Cirugía cardiovascular	9,1
4. UCI	8,4
5. Digestivo	5,2
6. Oncología médica	5,2
7. Reanimación	4,3
8. Urgencias	4,0
9. UCI infantil	3,4
10. Cirugía cardiovascular pediátrica	1,8

El 54% de las unidades transfundidas corresponden a servicios distintos de hematología
UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

• **Profilaxis cuando la trombocitopenia es crónica y no es reversible**: en aplasia medular crónica estable y en síndromes mielodisplásicos sin tratamiento o incluso cuando está con tratamiento oral y/o azatioprina.

No transfundir profilácticamente. Solo si sangrado (2B).

Si sangrado crónico ≥ 2 de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), transfundir profilácticamente.

Estas recomendaciones están reconocidas por la mayoría de las guías internacionales[1,4-6] a excepción del grupo alemán, que recomienda transfusión profiláctica por debajo de 5 × 10⁹/L. Conviene tener en cuenta el consumo de recursos y la calidad de vida en este grupo particular de pacientes.

• **Profilaxis en situaciones reversibles** no generadas por QT. Aunque las situaciones clínicas pueden variar según las condiciones basales de cada paciente, se puede considerar de igual forma que los pacientes hematológicos con QT (2C)[1].

• **Profilaxis ante procedimientos invasivos y cirugía**:

– **No transfundir, independientemente de la cifra de plaquetas, previamente a**[1]:

- Biopsia de médula ósea (1B).
- Catéteres centrales de inserción periférica (PIC) (2C).
- Retirada de catéteres centrales (2C).
- Cirugía de cataratas (2C).

– **Rango hemostático para los siguientes procedimientos**:

- Catéteres centrales con guía ecográfica: 20 × 10⁹/L (1B). Tanto en catéteres no tunelizados[7].
- Punción lumbar: 40 × 10⁹/L (2C). No existe información de estudios de buena calidad. Este umbral se apoya en casos sueltos y guías. Se recomienda que la cifra esté estable, que no haya alteraciones de la coagulación y una función plaquetaria normal[9].
- Colocación/Retirada de catéter epidural: 80 × 10⁹/L (2C).
- Cirugía mayor: 50 × 10⁹/L (1C)[1,6,10].
- Neurocirugía y cirugía polo posterior ojo: 100 × 10⁹/L (1C).
- Biopsia hepática percutánea: 50 × 10⁹/L (2B)[11].
- Biopsia renal[1]. Previamente a una biopsia renal se debe corregir la anemia con hierro, eritropoyetina (EPO) y diálisis (1B). Si es urgente, poner desmopresina previa (1B). No se debe transfundir plaquetas puesto que adquirirán la disfunción urémica rápidamente (1B).

• **Transfusión de plaquetas como tratamiento de una hemorragia**:

– Sangrado grave: 50 × 10⁹/L (1C)[1,6,10]. Valorar el inicio empírico ante una hemorragia grave independientemente de la cifra de plaquetas (1C).

– Politraumatizado, trauma craneoencefálico grave o hemorragia intracraneal: 100 × 10⁹/L (2C). En pacientes con sangrado no grave y que no compromete la vida, considerar transfundir por debajo de 30 × 10⁹/L (2C).

• **Transfusión de plaquetas en disfunción plaquetaria congénita**. La primera línea del tratamiento y la prevención de la hemorragia en la trombastenia de Glanzmann (TG) es emplear factor VII recombinante[12]. El uso de ácido tranexámico más desmopresina se recomienda para el resto de las alteraciones congénitas (2B).

Si los fármacos están contraindicados, son inefectivos o existe un alto riesgo de hemorragia muy grave, considerar añadir la transfusión de plaquetas (2C)[13]. En la TG considerar plaquetas HLA compatibles para la prevención de la aloinmunización (2C).

• **Transfusión en disfunción plaquetaria adquirida**[1]. No se debe transfundir plaquetas preprocedimiento si el antiagregante no ha sido suspendido (2C). Se debe valorar la vida media de cada fármaco antiagregante.

Usar medidas hemostáticas generales para tratar las hemorragias de los pacientes en tratamiento con ácido acetilsalicílico, antagonistas de P2Y12 e inhibidores de la glicoproteína IIa/IIIB. Considerar suspender esta medicación y revertir, en su caso, el anticoagulante asociado (2C) (Tablas 2 y 3).

Usar ácido tranexámico cuando el riesgo-beneficio sea favorable (1B).

Transfundir plaquetas solo como medida adicional cuando exista un sangrado grave (2C).

Considerar la transfusión de plaquetas para prevenir el sangrado en los casos de trombocitopenia severa menor de 10 × 10⁹/L producida por abciximab (2C).

• **Trombocitopenia inmune**:

– **Trombocitopenia inmune primaria**. No están indicadas las transfusiones profilácticas (1C).

Solo transfundir previamente a una intervención cuando hayan fracasado todas las medidas y/o la cirugía sea urgente[1]. Los umbrales habituales no se suelen alcanzar, pueden ser innecesarios y cada caso debe valorarse individualmente (1C).

Transfundir plaquetas (puede que más que una dosis) cuando exista una hemorragia grave (1C). Valorar

Tabla 2. Consideraciones generales para la transfusión de plaquetas en pacientes bajo tratamiento con antiagregantes orales

Características	AAS	Clopidogrel	Prasugrel
Inicio de acción	Minutos	< 24 h	< 24 h
Vida media (h)	0,5	7-8	7
Reversión del efecto (días)	3-5	5	5-9
Riesgo sangrado	+	+++	++++
Tx plaquetas Qx urgente	No	1 *pool*	1 *pool*
NeuroQx, Qx polo posterior ojo o hemorragia intracraneal	1 *pool*	2 *pooles*	2 *pooles*
Qx electiva	No esperar	5 días	5 días

AAS: ácido acetilsalicílico; Qx: cirugía; Tx: transfusión

Tabla 3. Consideraciones para la transfusión de plaquetas en pacientes con antiagregantes parenterales

Características	Abciximab	Eptifibatida	Tirofibán
Inicio de acción	Inmediato	Inmediato	Inmediato
Vida media (h) Plasma Receptor	 20-30 min Días	 2,5 h < 4 h	 1,4-1,8 h < 6 h
Reversión del efecto	12-18 h	< 4 h	< 6 h
Riesgo sangrado	+++	+++	+++
Tx plaquetas Qx urgente	No	No	No
NeuroQx, Qx polo posterior ojo o hemorragia intracraneal	1 *pool*	1 *pool*	1 *pool*
Qx electiva	No esperar	No esperar	No esperar

Tx: transfusión; Qx: cirugía

la coadministración de inmunoglobulinas intravenosas (IGIV) (2C).

– **Trombocitopenia inducida por heparina**. En los estudios más recientes que suman 41 pacientes no se ha relacionado la transfusión de plaquetas con eventos trombóticos[14].

– Púrpura postransfusional. Las IGIV son el tratamiento de elección (1C)[1].

• **Púrpura trombótica trombocitopénica (PTT)**. Con carácter general, la transfusión de plaquetas se considera contraindicada[15,16]; sin embargo, la evidencia clínica disponible es muy escasa y de signo incierto. Emplear transfusión de plaquetas en la PTT cuando exista un sangrado que comprometa la vida (1C)[1].

› Riesgos asociados a la transfusión de plaquetas

Se recomienda establecer una estrategia para respetar el grupo ABO, sobre todo en pacientes con transfusión regular (2B)[1].

Se pueden transfundir plaquetas ABO incompatibles para reducir la caducidad. Las plaquetas con título bajo de isohemaglutininas y las distintas de O tienen menor riesgo de hemólisis. Si están suspendidas en solución aditiva, el riesgo se reduce (1B)[17,18].

Transfundir plaquetas Rh D negativo a las niñas y mujeres en edad fértil. En el caso de que reciban plaquetas Rh D positivas, poner gammaglobulina anti-D (1B)[1,19].

Niños < 18 años, portadores de anticuerpos anti-D y adultos dependientes de transfusión de plaquetas, intentar respetar el Rh D. Se pueden poner Rh D positivas en los casos de caducidad y falta de *stock*. No poner vacuna en estos casos (1B)[1,19].

En caso de reacciones alérgicas graves, emplear plaquetas suspendidas en solución aditiva al 100% o lavadas (1B).

La transfusión de plaquetas con su grado de evidencia para los pacientes con refractariedad plaquetaria se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Consideraciones para la transfusión de plaquetas en pacientes con refractariedad plaquetaria

Transfusión de plaquetas en pacientes refractarios
Transfundir plaquetas ABO compatible (2C)
No transfundir plaquetas HLA en refractariedad no inmune (2C)
Transfundir plaquetas HLA en refractariedad anti-HLA (2C)
Si anti-HPA añadido, también añadir compatibilidad con este anticuerpo (2C)

blecida en cuanto a la indicación y el umbral de la transfusión de plaquetas, existen otros muchos contextos clínicos más donde la evidencia es más débil, pero no menos importante, debido al número de solicitudes indicadas en dichos contextos no hematológicos. Es de vital importancia a la hora de la indicación de la transfusión de plaquetas hacer un balance entre los riesgos y los beneficios de esta terapia, así como tener en cuenta la evidencia científica disponible.

Tabla 5. Propuesta de la Sociedad Británica de Hematología para el control de las reservas de plaquetas en situaciones de escasez: la categoría 1 sería la más urgente de atender y la categoría 3 la que menos prioridad tendría

Categoría 1	Categoría 2	Categoría 3
Hemorragia masiva y cuidados intensivos Transfusión masiva, hemorragia obstétrica, politraumatizado Mantener plaquetas por encima de 50×10^9/L, $> 100 \times 10^9$/L en trauma craneoencefálico Hemorragia en CID: mantener $> 50 \times 10^9$/L	**Cuidados intensivos** Pacientes que vienen de la categoría anterior Mantener plaquetas $> 50 \times 10^9$/L Cirugía Cirugía urgente pero no es una emergencia Procedimientos invasivos en pacientes trombocitopénicos siguiendo los umbrales mencionados en este texto o en las guías	**Cirugía** Cirugía electiva, no urgente en pacientes con trombocitopenia que requieren transfusión de plaquetas o presenten una trombopatía adquirida o congénita
Fallo medular Hemorragia activa asociada a trombocitopenia severa o trombopatía **Trombocitopenia inmune** Hemorragia que compromete la vida	**Fallo medular** Indicaciones que se encuadran en la categoría 1 o 3	**Fallo medular** Transfusión profiláctica en pacientes estables con un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos
Neonatos Trombocitopenia neonatal aloinmune o trombocitopenias por debajo de $20\text{-}30 \times 10^9$/L Niveles más altos pueden ser necesarios en neonatos de muy bajo peso, con sangrado o con hemorragia intracraneal		

› Transfusión de plaquetas en situaciones de existencias reducidas

En la Tabla 5 se presenta una guía general para el uso de las plaquetas en un contexto en el que se disponga de reservas limitadas[1]. La categoría 1 considera aquellos pacientes en los que la transfusión de plaquetas tiene una prioridad muy alta. Los pacientes de la categoría 3 tienen menor preferencia y, por tanto, son los pacientes a los que primero se les puede diferir o evitar la transfusión.

› Conclusiones o consideraciones finales

Al igual que la transfusión de plaquetas en el paciente hematológico que recibe QT está bastante bien esta-

› Bibliografía

1. 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.
2. 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 Sep 30;(9):CD010981.
3. Stanworth SJ, Estcourt LJ, Llewelyn CA, Murphy MF, Wood EM; TOPPS Study Investigators. Impact of prophylactic platelet transfusions on bleeding events in patients with hematologic malignancies: a subgroup analysis of a randomized trial. Transfusion. 2014 Oct;54(10):2385-93.
4. Kaufman RM, Djulbegovic B, Gernsheimer T, Kleinman S, Tinmouth AT, Capocelli KE, et al. Platelet transfusion: a clinical practice guideline from the AABB. Ann Intern Med. 2015 Feb 3;162(3):205-13.

5. Schiffer CA, Bohlke K, Delaney M, Hume H, Magdalinski AJ, McCullough JJ, et al. Platelet Transfusion for Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. J Clin Oncol. 2018 Jan 20;36(3):283-99.
6. Liumbruno G, Bennardello F, Lattanzio A, Piccoli P, Rossetti G; Italian Society of Transfusion Medicine and Immunohaematology (SIMTI) Work Group. Recommendations for the transfusion of plasma and platelets. Blood Transfus. 2009 Apr;7(2):132-50.
7. Zeidler K, Arn K, Senn O, Schanz U, Stussi G. Optimal preprocedural platelet transfusion threshold for central venous catheter insertions in patients with thrombocytopenia. Transfusion. 2011 Nov;51(11):2269-76.
8. Haas B, Chittams JL, Trerotola SO. Large-bore tunneled central venous catheter insertion in patients with coagulopathy. J Vasc Interv Radiol. 2010 Feb;21(2):212-7.
9. Van Veen JJ, Nokes TJ, Makris M. The risk of spinal haematoma following neuraxial anaesthesia or lumbar puncture in thrombocytopenic individuals. Br J Haematol. 2010 Jan;148(1):15-25.
10. Samama CM, Djoudi R, Lecompte T, Nathan N, Schved JF; French Health Products Safety Agency (AFSSAPS) Expert Group. Perioperative platelet transfusion. Recommendations of the French Health Products Safety Agency (AFSSAPS) 2003. Minerva Anestesiol. 2006 Jun;72(6):447-52.
11. Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, Nelson RC, Smith AD; American Association for the Study of Liver Diseases. Liver biopsy. Hepatology. 2009 Mar;49(3):1017-44.
12. Bakdash S, Lyons JM, Bastacky SI, Pezzone MA, McGee JB, Schoen RE, et al. Management of persistent gastric bleeding in a patient with Glanzmann's thrombasthenia. Am J Hematol. 2008 May;83(5):411-5.
13. Bolton-Maggs PHB, Chalmers EA, Collins PW, Harrison P, Kitchen S, Liesner RJ, et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. Br J Haematol. 2006 Dec;135(5):603-33.
14. Refaai MA, Chuang C, Menegus M, Blumberg N, Francis CW. Outcomes after platelet transfusion in patients with heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost. 2010 Jun;8(6):1419-21.
15. Peigne V, Pérez P, Resche Rigon M, Mariotte E, Canet E, Mira JP, et al. Causes and risk factors of death in patients with thrombotic microangiopathies. Intensive Care Med. 2012 Nov;38(11):1810-7.
16. Scully M, Hunt BJ, Benjamin S, Liesner R, Rose P, Peyvandi F, et al. Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. Br J Haematol. 2012 Aug;158(3):323-35.
17. Tobian AAR, Fuller AK, Uglik K, Tisch DJ, Borge PD, Benjamin RJ, et al. The impact of platelet additive solution apheresis platelets on allergic transfusion reactions and corrected count increment (CME). Transfusion. 2014 Jun;54(6):1523-9; quiz 1522.
18. Serious Hazards of Transfusion. Report, Summary and Supplement 2014. Disponible en: https://www.shotuk.org/shot-reports/report-summary-supplement-2014-2/.
19. Cid J, Lozano M, Ziman A, West KA, O'Brien KL, Murphy MF, et al. Low frequency of anti-D alloimmunization following D+ platelet transfusion: the Anti-D Alloimmunization after D-incompatible Platelet Transfusions (ADAPT) study. Br J Haematol. 2015 Feb;168(4):598-603.

Nuevos estándares CAT en transfusión

José M.ª García Gala
Fundación CAT. Servicio de Hematología, Hospital Universitario Central de Asturias

En 1973, la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) creó el **Programa de Acreditación de Bancos de Sangre (PABAS)** con la idea de mejorar la calidad en la obtención y la transfusión de la sangre y sus componentes. Este programa estableció las primeras normas de calidad y una metodología para la realización de las inspecciones, cuyo objetivo era comprobar su cumplimiento en los bancos de sangre que solicitaban la certificación.

Tras la fundación de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea (SETS) en 1988, se llega a un acuerdo entre la SEHH y la SETS sobre el funcionamiento de este programa que cambia su denominación a **Comité en Acreditación en Transfusión** (CAT) en 1996. En 2008 se transforma en fundación y se pasa a llamar **Fundación del Comité de Acreditación en Transfusión, Terapia Celular y Tisular (FCAT)**. En 2010 se logra la certificación por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) según la norma ISO 17.065 que acredita entidades certificadoras. En los últimos años se ha llegado a acuerdos con la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) y el Joint Accreditation Committee ISCT-Europe & EBMT (JACIE) para la certificación de bancos de sangre de cordón umbilical y programas de trasplante hematopoyético.

Este programa ha sido un instrumento decisivo para la mejora de la medicina transfusional en nuestro país a lo largo de estos casi 50 años.

El funcionamiento del CAT se basa en 2 pilares fundamentales: los auditores y los estándares.

Los auditores y miembros del Comité Técnico son la base fundamental del CAT. Los auditores del CAT no son inspectores de la administración o trabajadores de empresas certificadores. Son profesionales con experiencia real y demostrada en el ámbito de la medicina transfusional pero capaces de llevar a cabo procesos de auditoría, como se demuestra con la acreditación según la norma ISO 17.605 por la ENAC. Esta acreditación pone de relieve la solvencia de las certificaciones emitidas por el CAT. Además de llevar a cabo esta actividad de auditoría, los miembros del CAT participan en la revisión y la elaboración de los estándares.

El segundo pilar son los estándares en los que se basa el proceso de auditoría. Desde el inicio, este programa de certificación se fundamenta en la existencia de una serie de requisitos (estándares) que establecen cuál debe ser la práctica correcta. A lo largo de los años, los estándares se han ido enriqueciendo no solo en aspectos técnicos, sino en conceptos de gestión de la calidad e incorporando aspectos normativos como los que se recogen en el RD 905/2018 sobre Normas de Correcta Fabricación[1].

Esta actualización de los estándares se lleva a cabo de acuerdo con el procedimiento establecido, que incluye una revisión interna por parte de los miembros del CAT, así como una colaboración por parte de otros profesionales expertos. Para llevar a cabo esta revisión se tiene en cuenta la normativa existente, guías (especialmente la Guía del Consejo de Europa), bibliografía, comentarios o sugerencias de los auditados y la experiencia de los miembros del CAT. Una vez elaborado un borrador, se pasa a consulta pública para recoger sugerencias y comentarios de todas las personas que quieran colaborar. De acuerdo con este procedimiento, a lo largo de los últimos 24 meses se ha revisado la 4.ª edición de los estándares[2], que finaliza con la publicación de la 5.ª edición de los Estándares del CAT en el ámbito de la medicina transfusional.

En esta nueva edición se introducen una serie de cambios que merece la pena destacar.

El primero es la denominación de los mismos. De **Estándares en Transfusión Sanguínea** han pasado a denominarse **Estándares en Hemoterapia**. Este cambio de nombre pone de manifiesto el propósito de abarcar un ámbito más amplio de la medicina transfusional y no solo lo relativo a la transfusión. Este propósito se concreta en esta nueva edición con la introducción de un capítulo relativo a las aféresis terapéuticas. De esta forma, las unidades de aféresis terapéuticas

de nuestro país se podrán certificar por la FCAT en función de estos estándares.

El segundo cambio importante es el cambio en la organización de los capítulos. Se mantiene la estructura de capítulos dedicados a una determinada área, pero ordenados de forma diferente a la edición previa. Los principales aspectos a destacar son:

• El capítulo dedicado al Sistema de Gestión de Calidad incluye lo relativo a reactivos y equipamientos, que en la 4.ª edición figuraba en capítulos independientes. Respecto a la edición previa, se separa la donación de sangre de la parte de preparación de los diferentes componentes. En la nueva edición se dedican capítulos diferentes.

• Se suprime el capítulo de donación autóloga, incorporando cada uno de los pasos de dicha donación bien sea en el capítulo de donación o en el capítulo de transfusión.

• Se han elaborado tablas que permiten una mejor comprensión de los requisitos.

El tercer cambio importante se relaciona con el contenido.

El cambio más importante puede ser la introducción de un capítulo dedicado a las aféresis terapéuticas, como se ha reflejado previamente. Pero, además de este, se puede destacar, por ejemplo, que el capítulo de Sistema de Gestión de Calidad de la 5.ª edición introduce conceptos como Normas de Correcta Fabricación, Gestión del Riesgo, Control de Cambios, Cualificación de Equipos y Validación de Procesos. Además, se establece qué equipos tienen que tener la consideración de equipos críticos. Frente a la edición anterior, donde cada centro definía qué equipos consideraba críticos, en la nueva edición se han establecido los equipos que deben tener dicha consideración, aunque cada organización los podría ampliar a un mayor número.

Otra novedad importante es que se establecen una serie de indicadores tanto para servicios como para centros de transfusión. La existencia de una serie de indicadores comunes puede servir para llevar a cabo estudios de *benchmarking* entre los diferentes centros.

En el apartado de donación, se introduce por primera vez una serie de requisitos relacionados con la promoción de la donación de sangre. Se han revisado los criterios existentes para exclusiones en casos como hepatitis (introduciendo referencias a la hepatitis E y técnicas de biología molecular) o malaria.

En la preparación de componentes sanguíneos se recoge la necesidad de disponer (o disponer de una planificación para su implantación) del sistema de codificación ISBT-128.

En el apartado de transfusión se introducen referencias a los programas de **Patient Blood Management**. Se desarrollan de forma más detallada temas como las funciones del Comité de Transfusión, la transfusión extrahospitalaria y la transfusión en pediatría.

Por último, en el apartado de Registros, estos se han intentado simplificar tomando como referencia los tiempos establecidos en las Normas de Correcta Fabricación y en la normativa.

En resumen, esta nueva edición de los estándares CAT supone un nuevo paso en la mejora de la calidad de la medicina transfusional y representan una oportunidad de mejora para todos los que nos dedicamos a dicha actividad.

› Agradecimientos

A todos los miembros de la FCAT, colaboradores y revisores que han hecho posible la publicación de esta nueva edición de los estándares.

› Bibliografía

1. Real Decreto 905/2018 de 20 de julio, por el que se modifica el Real Decreto 1343/2007, de 11 de octubre, por el que se establecen normas y especificaciones relativas al sistema de calidad de los centros y servicios de transfusión.
2. Anguita Velasco J, Aramburu Urtasun E, Arbona Castaño C, Arroyo Rodríguez JL, Barea García LM, Callao Molina V, et al. Estándares en Transfusión Sanguínea. 4.ª ed. Fundación CAT; 2012.

TERAPIA GÉNICA Y CELULAR EN HEMATOLOGÍA

Coordinadores: **Dr. Jorge Sierra Gil.** Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona
Dr. José Antonio Páramo Fernández. Clínica Universidad de Navarra. Pamplona

La terapia génica representa una opción terapéutica para diversas enfermedades, fundamentalmente monogénicas, más allá de las aproximaciones tradicionales. El objetivo es conseguir una expresión duradera del gen a un nivel suficiente para mejorar o curar los síntomas de la enfermedad con mínimos efectos adversos. La terapia génica se está convirtiendo rápidamente en una nueva estrategia terapéutica en la hemofilia y en diversas hemoglobinopatías.

En la década de 1990 se demostró experimentalmente una expresión eficiente de factor IX empleando vectores adenovirales, sentando las bases para un ensayo clínico en pacientes con hemofilia B con tasas aceptables de factor, pero durante cortos periodos de tiempo. Mejoras en el empleo de estos vectores resultaron en niveles de factor IX entre 2 y 5% durante periodos prolongados. Estos progresos se han extendido a los pacientes con hemofilia A en los que la expresión del gen conlleva niveles circulantes de factor VIII de más de 50%, pudiendo persistir hasta tres años y, lo que es más importante, con mejoría significativa del cuadro hemorrágico. El **Dr. Pasi** (London School of Medicine, Londres) revisa los principales ensayos clínicos empleando terapia génica en hemofilia que pueden suponer un cambio de paradigma terapéutico, al permitir una expresión duradera del gen, si bien existen temas sin resolver en relación a selección de pacientes, respuesta inmune y otros efecto secundarios, siendo asimismo importante el aspecto económico.

La terapia génica también se ha aplicado exitosamente en diversas hemogobinopatías, tales como anemia de células falciformes (anemia drepanocítica) y β-talasemia. Importantes descubrimientos recientes, tales como el conocimiento exacto de la región que controla el locus de la globina β, así como diversos factores de transcripción que determinan cambios en la hemoglobina, han permitido diseñar diversas aproximaciones génicas. Se ha demostrado la eficacia de vectores lentivirales para insertar ADN en células madre hematopoyéticas, así como la edición génica para restaurar la expresión de hemoglobina fetal o la expresión normal del gen de la globina β. Los trabajos clínicos más recientes en el ámbito de la β-talasemia y anemia drepanocítica muestran resultados prometedores en dos direcciones: posibilidad de discontinuar las transfusiones o reducción en los requerimientos transfusionales.

La **Dra. L. Joseph** (Hospital Necker, Paris), con experiencia en terapia génica de hemoglobinopatías, revisa el papel de esta nueva estrategia y discute las principales barreras para su adopción de manera generalizada.

La modificación del genoma ha generado un intenso debate sobre sus condicionantes éticos. En el presente simposio, se analizarán en profundidad los aspectos filosóficos y la regulación española y europea sobre terapia génica y sus límites. En síntesis, debe prevalecer el "principio de precaución" teniendo muy en cuenta los posibles efectos a medio y largo plazo, que el objetivo de la terapia sea corregir un defecto genético que sin duda condicione una enfermedad grave, sin alternativa de tratamiento satisfactoria y que, por tanto, se trate de una manipulación con fines terapéuticos y finalmente que se garantice la seguridad en todos los pasos del proceso. Un aspecto de gran relevancia también, recogido en la

regulación es que no podrán realizarse ensayos de terapia génica que produzcan modificaciones en la identidad genética germinal del sujeto.

También en el simposio se aborda el tema de una modalidad de tratamiento que incluye en uno de sus pasos la modificación genética de células humanas, la terapia CAR (*chimeric antigen receptor*) con linfocitos T (CAR-T) que expresan esos receptores en su membrana, Esta terapia disruptiva ofrece perspectivas de respuesta y supervivencia prolongada, probablemente curaciones, a pacientes cuyo tumor se ha mostrado resistente a múltiples líneas de tratamiento. Los resultados en niños y adolescentes con leucemia linfoblástica aguda B sin otras opciones son espectaculares en muchos casos y en pacientes adultos con linfoma de células grandes de línea B se obtiene una respuesta completa mantenida en aproximadamente el 40-50% de los casos. Esta terapia se extiende ya a otras neoplasias hematológicas, entre otras el mieloma múltiple que se aborda en este simposio. Los resultados en esta enfermedad han comenzado a publicarse y existen numerosos ensayos en marcha que aportaran información adicional sobre toxicidad y eficacia. Cabe esperar que haya disponibilidad de CARTs comerciales frente a mieloma en España en un período de aproximadamente un año y medio.

Los ponentes de este simpoio son todos grandes expertos en las materias que van a tratar, los que garantiza un gran nivel científico y educativo.

Gene therapy for haemophilia

John Pasi
Haemostasis and Thrombosis, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, London

Gene therapy in haemophilia has had a chequered history with many apparent false starts. However, with the progressive development of robust adeno-associated virus (AAV) based technologies since the initial reports of the first-generation approach in 2011, the latest AAV gene therapies have allowed the field to be increasingly optimistic regarding the potential for gene therapy in haemophilia. Early safety data released over the last 2 to 3 years from these studies are very encouraging, albeit in a small number of patients. In addition, the levels of factor VIII and factor IX that have been demonstrated in these latest studies have been impressive and way above the early targets of low single figure improvements with the initial programmes. The improvement in outcome with reduced bleeding and treatment burden has, across all programmes, been profound.

However, the relatively large variation among patients needs to be more fully understood. There are now multiple gene therapy programmes being studied and the field is very crowded –this presentation will cover and review the recent published and emerging data from the clinical trials now being undertaken.

However, aside from consolidating current data in phase 3 programmes in the next few years, there remain many questions we need to address in parallel. One can also see that many patients with haemophilia fall outside the relatively narrow selection criteria –the need to open access to wider groups of patients, including children, and understanding the impact of associated comorbidities will be an ongoing challenge. Scientific questions also remain, particularly in relation to immune response to vectors and liver function abnormalities. Given that durability remains uncertain at this stage, one must continue to see the need for long term follow up of patients as essential and registers will need to be established to ensure that the appropriate data is collected. These questions represent but a few of the scientific and clinical issues in gene therapy that we need to address.

Aside the science, a considerable and obvious unanswered question to consider remains –cost and how can we address the inevitable substantial initial costs of gene therapy in order to make it available to our patients.

CAR-T en mieloma múltiple

Javier Briones
Servicio de Hematología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona

La inmunoterapia adoptiva con células T modificadas con receptores quiméricos antígeno-específicos (CAR) ha revolucionado el campo de la inmunoterapia del cáncer, en especial en las neoplasias hematológicas B. Los estudios clínicos con un CAR dirigido frente al antígeno 19 (CAR19) han mostrado resultados excelentes en pacientes con leucemia aguda linfoblástica B y linfoma no Hodgkin B en situación de refractariedad o tras múltiples líneas de tratamiento. Estos resultados han promovido el desarrollo de CAR para otras neoplasias hematológicas, como el mieloma múltiple (MM).

En los últimos años se han desarrollado CAR dirigidos frente a diversos antígenos expresados en las células de mieloma: BCMA, CD38, CD138, CD19, GPRD5C o CD44v6. Como en todas las situaciones de inmunoterapia celular, el antígeno ideal es aquel que presenta una alta expresión específicamente en células plasmáticas tumorales, con expresión muy restringida en tejidos normales. Una de las dianas que cumple este requisito es el antígeno de maduración de células B (BCMA).

BCMA pertenece a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) y, a través de la unión a ligandos como BLyS/BAFF o APRIL, interviene de forma importante en la regulación de la maduración y la diferenciación de las células B[1]. La expresión de BCMA aumenta durante la diferenciación a células plasmáticas y se encuentra elevada en la mayoría (60-100%) de los mielomas, mientras que su expresión es mínima o ausente en tejidos normales no hematopoyéticos.

El primer estudio de terapia CAR-T-BCMA fue realizado por investigadores del Instituto Nacional de Cáncer (EE.UU.), en un reducido grupo de pacientes con MM refractario (mediana de 7 líneas de tratamiento). En este ensayo fase I se obtuvieron respuestas completas (RC) en aquellos casos que recibieron la dosis más alta de CAR-T-BCMA[2]. Estos datos constituyeron la base para el desarrollo de un ensayo con un CAR-BCMA de segunda generación (coestimulación 4-1BB) en pacientes con MM refractario, cuyos resultados acaban de ser presentados[3]. En este estudio se trataron 33 pacientes (21 en la fase I y 12 en la fase de expansión). La mediana de tratamientos recibidos fue de 7 y más del 90% había recibido un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TASP). La dosis de CAR-T-BCMA osciló entre 50 y 800 millones de células CAR+, administradas tras un acondicionamiento linfodeplecionante que incluyó ciclofosfamida y fludarabina. Un 85% de los pacientes respondieron, con una tasa de RC del 45% y una duración de la respuesta de 11 meses. El síndrome de liberación de citocinas (SLC) ocurrió en un 76% de los pacientes, mayoritariamente de grados 1 o 2, y las complicaciones neurológicas ocurrieron en un 42%, prácticamente todas de grado 1-2. Estos resultados, en un grupo de pacientes altamente tratados, han estimulado el desarrollo de numerosos ensayos con CAR-BCMA, con ciertas diferencias como el uso de vector retroviral *versus* lentiviral o la utilización de un CAR con un anticuerpo anti-BCMA humano. Esta última estrategia tiene el objetivo de evitar la respuesta inmune frente a la región murina, que puede ocurrir en algunos pacientes que reciben un CAR con una secuencia del anticuerpo derivado de ratón. En este sentido, los resultados preliminares de 2 ensayos con un CAR-BCMA humano (*UPenn* y *Bluebirdbio*) muestran una tasa de respuestas globales (RG) similar en una población de pacientes con MM similar a la anteriormente descrita (64-96%, respectivamente), por lo que está por demostrar si esta estrategia se traduce en resultados clínicamente mejores. En concreto, en el estudio desarrollado en la University of Pennsylvania[4], se trataron 25 pacientes (mediana de tratamientos previos de 7), distribuidos en 3 cohortes distintas según la dosis, la cual se administró a su vez repartida en 3 días (10% de la dosis total el día 1, 30% el día 2 y 60% el día 3), en función de la existencia de complicaciones como SLC. Teniendo en cuenta que con este esquema un 16% de los pacientes solo recibieron las 2 dosis más

bajas, la tasa global de respuestas fue del 64% con 2 pacientes en RC (una de ellas astringente). La duración mediana de la respuesta y la supervivencia libre de progresión fue de aproximadamente 4 meses, de forma que solo 3 pacientes en total permanecían sin progresión en el momento de la presentación de los resultados. Es de destacar que, si bien no se han observado recidivas o progresión del mieloma sin expresión del BCMA, las células de MM residuales tras el tratamiento en la mayoría de los pacientes mostraban una clara disminución de la expresión de BCMA. En este estudio la mayoría de los pacientes (88%) tuvieron SLC, que fue severo (grado 3-4) en un tercio de ellos. Complicaciones neurológicas –*immune effector cell* (IEC)-*associated neurotoxicity syndrome* (ICANS)– se observaron en 8 (32%) de los pacientes, las cuales fueron severas en 3, incluyendo un paciente con edema cerebral que requirió altas dosis de prednisona.

En resumen, los resultados clínicos de la terapia CAR-T-BCMA en pacientes con MM muestran en general una tasa de respuestas muy alta, pero con una duración relativamente corta, pues la mayoría de los pacientes presentan una progresión de su enfermedad en el primer año postratamiento. Por este motivo, se están desarrollando nuevas estrategias con el objetivo de aumentar la eficacia clínica: administración del CAR-BCMA conjuntamente con inhibidores de gamma-secretasa, para aumentar la expresión del BCMA en las células tumorales, o el uso de un CAR-BCA en el que el anticuerpo esté dirigido hacia 2 epítopes distintos en la molécula BCMA. En cualquier caso, todas estas estrategias, aunque novedosas y muy interesantes desde el punto de vista biológico, deben validarse en ensayos clínicos adecuados. Así, un estudio preliminar en 17 pacientes tratados con un CAR-BCMA con doble especificidad antigénica mostró una elevada tasa de respuestas (88% RG, 74% RC), si bien solo un 20% de los pacientes estaban libres de progresión a los 2 años[5].

Si bien BCMA es la diana más utilizada actualmente en la inmunoterapia CAR-T del MM, existen otras para las cuales empiezan a desarrollarse nuevos CAR.

CS1/SLAMF7 es una molécula expresada en células del sistema inmune (NK, T, B células dendríticas) con funciones activadoras o supresoras, según la célula donde se exprese. Es también el ligando del anticuerpo elotuzumab, lo que ha facilitado el diseño de CAR dirigidos hacia CS1/SLAMF7[6]. Esta molécula presenta una alta expresión en prácticamente 100% de los MM.

Estudios preclínicos han demostrado que células CAR-T anti-CS1/SLAMF7 tienen citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* en modelos de mieloma[7], por lo que podría ser una interesante opción para terapia CAR-T del mieloma.

CD138 (sindecan 1) se expresa en células plasmáticas (benigna y en mieloma), por lo que es una diana interesante para terapia CAR en MM. Sin embargo, su desarrollo clínico ha sido restringido a un pequeño ensayo en China, con 5 pacientes. La escasa actividad clínica (ninguna respuesta) y el hecho de que CD138 se expresa en múltiples tipos de células epiteliales hacen que esta diana haya perdido actualmente interés para el desarrollo clínico de terapia CAR.

Otros CAR diseñados frente a CD19 y la cadena ligera κ de la inmunoglobulina se han utilizado en estudios piloto, en pacientes con MM, si bien con escasa actividad terapéutica.

Recientemente, se ha descrito el desarrollo de CAR frente a 2 moléculas novedosas que han suscitado gran interés.

GPRD5C es una molécula receptor acoplado a proteína G con expresión en MM similar a la de BCMA. Estudios preclínicos recientes han demostrado que un CAR anti-GPRD5C tiene actividad frente a MM en modelos *in vivo*, comparable a la de un CAR BCMA[8], por lo que un CAR GPRD5C podría ensayarse en pacientes con MM en recidiva tras inmunoterapia con CAR BCMA o cuyos tumores posean una baja expresión de BCMA. Por otra parte, la expresión de GPRD5C es independiente de BCMA en MM, lo que sugiere que el diseño de un CAR biespecífico dirigido simultáneamente a ambos antígenos podría tener relevancia clínica. Es de esperar el inicio de ensayos clínicos con un CAR GPRD5C próximamente, en pacientes con MM.

Por último, CD44 es una glicoproteína expresada en numerosos tejidos incluyendo tumores. Una característica que la hace atractiva para inmunoterapia es su alta heterogeneidad, debida a modificaciones postranscripcionales, incluyendo patrones de glicosilación, las cuales puede tener un comportamiento diferencial en tumores. Así, la isoforma variante 6 de CD44 (CD44v6) se expresa preferentemente en monocitos y queratinocitos, y en un alto porcentaje (80%) de MM. Recientemente, se ha demostrado que un CAR de segunda generación (CD28) dirigido frente a CD44v6 tiene efectividad antitumoral en modelos de mieloma[9]. Esto ha llevado al desarrollo de

un ensayo clínico de un CAR CD44v6 en pacientes con MM refractarios (*EureCART*), el cual se iniciará próximamente en varios países europeos, incluyendo España.

En resumen, BCMA representa actualmente la principal diana para terapia CAR-T, obteniéndose una alta tasa de respuestas en pacientes con MM en recidiva tras múltiples líneas de tratamiento. Sin embargo, la mayoría de los pacientes no tiene respuestas duraderas y la progresión ocurre muy frecuentemente. Es necesario, por tanto, explorar nuevas estrategias, como utilizar CAR dirigidos hacia nuevas dianas, el desarrollo de CAR biespecíficos dirigidos simultáneamente frente a 2 antígenos expresados en MM o la combinación de CAR con agentes inmunomoduladores que incrementen su actividad citotóxica, como lenalidomida.

› Bibliografía

1. Cho SF, Anderson KC, Tai YT. Targeting B Cell Maturation Antigen (BCMA) in Multiple Myeloma: Potential Uses of BCMA-Based Immunotherapy. Front Immunol. 2018;10;9:1821-36.
2. Ali SA, Shi V, Maric I, Wang M, Stroncek DF, Rose JJ, et al. T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. Blood. 2016;128(13):1688-70.
3. Raje N, Berdeja J, Lin Y, Siegel D, Jagannath S, Madduri Dr JN, et al. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. N Engl J Med. 2019;380(18):1726-37.
4. Cohen AD, Garfall AL, Stadtmauer EA, Melenhorst JJ, Lacey SF, Lancaster E, et al. B cell maturation antigen-specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma. J Clin Invest. 2019;129 (6):130-42.
5. Xu J, Chen LJ, Yang SS, Sun Y, Wu W, et al. Exploratory trial of a biepitopic CAR T-targeting B cell maturation antigen in relapsed/refractory multiple myeloma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 May 7;116(19):9543-51.
6. Chu J, He S, Deng Y, Zhang J, Peng Y, Hughes T, et al. Genetic modification of T cells redirected toward CS1 enhances eradication of myeloma cells. Clin Cancer Res. 2014;20(15):3989-400.
7. Gogishvili T, Danhof S, Prommersberger S, Rydzek J, Schreder M, Brede C, et al. SLAMF7-CAR T cells eliminate myeloma and confer selective fratricide of SLAMF7+ normal lymphocytes. Blood. 2017;130(26):2838-47.
8. Smith EL, Harrington K, Staehr M, Masakayan R, Jones J, Long TJ, et al. GPRC5D is a target for the immunotherapy of multiple myeloma with rationally designed CAR T cells. Sci Transl Med. 2019;11(485).
9. Casucci M, Nicolis di Robilant B, Falcone L, Camisa B, Norelli M, et al. CD44v6-targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia and multiple myeloma. Blood. 2013;122(20):3461-72.

Aspectos éticos y jurídicos de la terapia génica

Pilar Nicolás Jiménez
Departamento de Derecho Público, Grupo de Investigación Cátedra de Derecho y Genoma Humano, Sistema Universitario Vasco IT 1066-16, Facultad de Derecho, Universidad del País Vasco

› Introducción

Las implicaciones éticas y jurídicas de la terapia génica coinciden en parte con las que presentan otras terapias innovadoras o, en general, novedosas, pero, además, la terapia génica supone la modificación del ADN, a través de diferentes tecnologías y en distintos niveles, lo que justifica una reflexión más particular.

Como ocurre con la experimentación de cualquier nueva terapia, es imprescindible la evaluación de los riesgos que representa para los sujetos, que pueden ser conocidos o no, lo que es más problemático, y para su traslación a la práctica clínica; por otra parte, se deben analizar otras cuestiones, como la relación coste/beneficio en su ofrecimiento.

En cuanto a la primera de las cuestiones, la evaluación de riesgos para los sujetos de los ensayos o los pacientes, la autorización de la terapia génica es objeto de unos procedimientos particulares como consecuencia de su elevada complejidad[1], según se verá, y más allá de estas cautelas se adoptan otras, porque sus efectos pueden incidir en terceros. Este factor relativo a la seguridad de la técnica es, para algunos, el único determinante para admitirla o no[2].

En relación con el análisis de otros factores, se tiene en cuenta no solo el componente económico más inmediato o evidente, sino también las consecuencias más generales y a más largo plazo que su implantación puede acarrear.

La terapia génica está regulada en el marco de la Unión Europea (UE) como medicamento de terapia avanzada que: "a. incluye un principio activo que contiene un ácido nucleico recombinante, o está constituido por él, utilizado en seres humanos, o administrado a los mismos, con objeto de regular, reparar, sustituir, añadir o eliminar una secuencia génica; b. su efecto terapéutico, profiláctico o diagnóstico depende directamente de la secuencia del ácido nucleico recombinante que contenga, o del producto de la expresión genética de dicha secuencia" –Reglamento (CE) N.° 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de noviembre de 2007 sobre medicamentos de terapia avanzada (capítulo 1, artículo 2) y Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de noviembre de 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano (anexo I, parte IV, según su última modificación)–.

El uso experimental de estos medicamentos presenta algunas particularidades por lo que se refiere a la solicitud de autorización para la fabricación no industrial (Real Decreto 477/2014, de 13 de junio, por el que se regula la autorización de medicamentos de terapia avanzada de fabricación no industrial) y también en relación con la evaluación y autorización de los ensayos clínicos, que requiere la intervención del Comité de Terapias Avanzadas y procedimientos centralizados en el nivel europeo. En la página web de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios está disponible toda la información relativa a esta cuestión, incluyendo lo previsto en el Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios, y en el Real Decreto 1090/2015, de 4 de diciembre, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, los Comités de Ética de la Investigación con medicamentos y el Registro Español de Estudios Clínicos.

La terapia génica a través de otros procedimientos no incluidos en la anterior definición estará sujeta a lo previsto en el Título II de Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, que establece las reglas generales para las investigaciones que implican procedimientos invasivos en seres humanos. El procedimiento invasivo está definido como "toda intervención realizada con

fines de investigación que implique un riesgo físico o psíquico para el sujeto afectado".

Cuando los efectos de la terapia se limitan a un cambio en las instrucciones de funcionamiento de los mecanismos biológicos del paciente, la evaluación de los riesgos se focaliza en él. Si el cambio se produce en otro nivel y afecta a la línea genética germinal, la situación es cualitativamente diferente y las implicaciones son radicalmente distintas en el plano ético y jurídico. El procedimiento en este caso puede tener consecuencias irreversibles más allá de un individuo.

Junto con las implicaciones y dificultades de la evaluación de riesgos, otra de las cuestiones que se ha discutido con profusión en relación con la alteración del ADN en línea germinal es la relativa al objetivo de la modificación, que marca también diferencias para su aceptación: el propósito "terapéutico" es más aceptado que el propósito "de mejora" (*enhancement*, que algunos, como Savulescu, también defienden)[3].

Recientemente, el Comité de Bioética de España ha publicado una Declaración sobre la edición genómica a propósito de la modificación genética embrionaria, llevada a cabo por el investigador He Jiankui, empleando la técnica del CRISPR/Cas9, con el objetivo de conseguir la inmunidad al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) mediante la edición del gen CCR5, en los siguientes términos: "El estado actual de tales técnicas, más allá de las dudas éticas que plantean, no ha superado el nivel de seguridad necesario para su uso clínico en humanos, por la posibilidad, entre otras, de alterar secuencias similares en el genoma fuera de los objetivos marcados. Si bien el empleo de dichas técnicas en el ámbito estrictamente curativo no está exento de problemas éticos, su uso con fines directos o indirectos de mejoramiento (la mera biología o ingeniería perfectiva), como ha ocurrido en el caso de las dos niñas nacidas en China, es absolutamente rechazable e inadmisible"[4].

› Intereses y derechos afectados

La identificación de los intereses y derechos implicados en la manipulación genética ha sido un asunto al que se ha prestado mucha atención desde el plano filosófico y jurídico. La discusión sobre la presencia de unos u otros, su entidad, límites o preeminencia ha conducido a tomar posturas sobre la aceptabilidad de estas técnicas y sobre la extensión de su licitud o su prohibición.

En España, en el plano jurídico, la discusión se ha desarrollado sobre todo a la hora de analizar el bien jurídico protegido en el delito de manipulación genética, que recogió el Código Penal de 1995, como se verá[5]. En el plano filosófico se han publicado recientemente dos completas revisiones de las diferentes corrientes y posturas, a la vista de las posibilidades que ofrecen las más novedosas técnicas de edición genética –del Nuffield Council of Bioethics[6] y del Comité de Ética de Alemania[7]–.

Según diferentes autores, los intereses y derechos que podrían verse afectados por la aplicación de estas técnicas son, resumida y esquemáticamente, los siguientes:

• Intereses y derechos reproductivos:

– Libertad reproductiva, que supone que las personas pueden decidir sobre las características de su descendencia.

– Protección de la salud reproductiva, que supone que las personas tienen derecho a una atención médica con el objetivo de evitar enfermedades en su descendencia.

• Intereses de la descendencia y/o de las generaciones futuras:

– Intimidad de los sujetos con ADN manipulado, cuya información genética se conocerá.

– Libertad del sujeto con ADN manipulado, que está determinado genéticamente por el carácter seleccionado intencionadamente.

– Salud/Bienestar del futuro individuo y/o grupos de individuos, lo que supone potencialmente la afectación a la salud/bienestar de la especie humana (en un doble sentido: posible perjuicio por los efectos nocivos de la manipulación o posible beneficio por los efectos positivos).

– Integridad genética del futuro individuo y/o grupos de individuos, lo que supone potencialmente la afectación a la integridad genética de la especie humana.

– Diversidad genética, que podría verse limitada.

– No discriminación para quienes no se hayan sometido a una manipulación genética.

– No discriminación para quienes no dispongan de medios para acceder a terapias innovadoras.

En general, como base fundamental para tomar decisiones en relación con las nuevas tecnologías y

su aplicación en la salud humana, es imprescindible el respeto al principio de precaución[8], recogido en la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica (artículo 2f). El principio de precaución "puede invocarse [...] cuando un fenómeno, un producto o un proceso puede tener efectos potencialmente peligrosos identificados por una evaluación científica y objetiva, si dicha evaluación no permite determinar el riesgo con suficiente certeza". En virtud de este principio, "las autoridades encargadas de la gestión del riesgo pueden decidir actuar o no actuar en función del nivel de riesgo. Si el riesgo es elevado, se pueden adoptar varias categorías de medidas. Se puede tratar de actos jurídicos proporcionados, de la financiación de programas de investigación, de medidas de información al público, etc."[9].

› La normativa internacional

En los años noventa del siglo pasado se comienza a plasmar en normas de distinta naturaleza la preocupación sobre las implicaciones de la terapia génica. Destaca, como uno de los primeros documentos que abordan este tema, la Declaración Universal de la UNESCO sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos, del año 1997, cuyo artículo 24 prevé que "El Comité Internacional de Bioética de la Unesco [...] presentará, de conformidad con los procedimientos reglamentarios de la Unesco, recomendaciones a la Conferencia General y prestará asesoramiento en lo referente al seguimiento de la presente Declaración, en particular por lo que se refiere a la identificación de prácticas que pueden ir en contra de la dignidad humana, como las intervenciones en línea germinal".

Ese mismo año, en el marco del Consejo de Europa, se adoptó el Convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la biología y la medicina (Convenio relativo a los derechos humanos y la biomedicina), que entró en vigor en España el 1 de enero del año 2000. Su artículo 13 establece que "Únicamente podrá efectuarse una intervención que tenga por objeto modificar el genoma humano por razones preventivas, diagnósticas o terapéuticas y solo cuando no tenga por finalidad la introducción de una modificación en el genoma de la descendencia".

El informe explicativo al Convenio justifica esta prohibición como respuesta a "los temores" que suscita la intervención en el genoma en relación con los peligros que puede suponer no solo para el individuo sino para la especie humana. El mayor "miedo", señala el informe, "es la modificación intencionada del genoma para producir individuos o grupos con ciertas características o cualidades seleccionadas"[10]. Se alude así a los dos argumentos más recurrentes en el debate: la afectación a la integridad del sujeto intervenido y también a la especie humana (este segundo menos evidente en cuanto a su valoración).

Por otra parte, el informe advierte que no quedan prohibidas las intervenciones somáticas que puedan tener efectos secundarios no deseados en línea germinal, como, por ejemplo, un tratamiento de cáncer por quimioterapia que pueda afectar al sistema reproductor del paciente. La prohibición de manipulación en línea germinal se limita, entonces, a procedimientos que la provoquen directamente, sin perjuicio de que sus efectos deban ser valorados en el análisis de riesgos que se lleva a cabo con carácter general en cualquier procedimiento experimental o clínico.

Desde entonces, se han sucedido numerosos pronunciamientos de distintas instituciones en relación con esta materia (comités de ética, asociaciones profesionales, etc.), que en su gran mayoría han seguido este mismo criterio. Menos homogénea se ha mostrado la doctrina científica, que ha mantenido diferentes argumentos y posturas en la discusión.

En paralelo, y como consecuencia de esta posición, la patente de procedimientos de modificación de la identidad genética germinal del ser humano quedó prohibida en la UE en el año 1998 (Directiva 98/44/CE, relativa a la protección jurídica de las invenciones biotecnológicas). Posteriormente, el Reglamento 536/2014 sobre ensayos clínicos de medicamentos de uso humano estableció que "no podrán realizarse ensayos de terapia génica que produzcan modificaciones en la identidad genética germinal del sujeto".

Sin embargo, parece que recientemente se está abriendo la puerta a un debate sobre nuevos enfoques también en el plano institucional, aunque de manera muy incipiente.

La *Recommendation* 2115 del año 2017, de la Asamblea Parlamentaria del Consejo de Europa, sobre el uso de nuevas tecnologías en el ser humano –*Recommendation 2115 (2017) concerning The use of new genetic technologies in human beings*– señala lo siguiente en relación con la prohibición del artículo 13 del Convenio de Derechos Humanos y Biomedicina: "*The convention does, however, also establish*

a specific procedure for its amendment (Article 32), which should be read in conjunction with Article 28, which imposes on States parties to ensure that the fundamental questions raised by the developments of biology and medicine are the subject of appropriate public discussion in the light, in particular, of relevant medical, social, economic, ethical and legal implications, and that their possible application is made the subject of appropriate consultation".

En este mismo sentido, el Grupo Europeo sobre Ética, Ciencia y Nuevas Tecnologías (European Group on Ethics in Science and New Technologies) ha publicado el *Statement on Gene Editing*, en el que se reconoce la existencia de diferentes posturas y la necesidad de promover el debate: "*As is the case in the scientific community at large, diverse views are represented in the group. We call for a broad public debate on these issues and are convinced that the EGE will make a useful contribution to these deliberations*"[11].

› Normativa en España (regulación nacional)

España es uno de los 40 países que ha regulado, en su legislación nacional, la manipulación genética. En la mayoría de estos países se ha seguido un criterio restrictivo dependiendo, con frecuencia, de que el propósito sea la terapia o "la mejora"[12].

La primera vez que en nuestro ordenamiento jurídico se planteó la prohibición fue en la Ley 35/1988, sobre técnicas de reproducción asistida (el artículo 15 permitía la investigación en preembriones *in vitro* viables si, entre otras condiciones, no se modificaba el patrimonio genético no patológico. Este criterio se mantiene en el artículo 13 de la actual Ley 14/2006, sobre técnicas de reproducción humana asistida).

Por otra parte, el Código Penal del año 1995 introdujo el delito de manipulación genética en los siguientes términos: "1. Serán castigados con la pena de prisión de dos a seis años e inhabilitación especial para empleo o cargo público, profesión u oficio de siete a diez años los que, con finalidad distinta a la eliminación o disminución de taras o enfermedades graves, manipulen genes humanos de manera que se altere el genotipo. 2. Si la alteración del genotipo fuere realizada por imprudencia grave, la pena será de multa de seis a quince meses e inhabilitación especial para empleo o cargo público, profesión u oficio de uno a tres años" (artículo 159).

Como se acaba de ver, este artículo castiga como delito la manipulación genética no terapéutica, sea somática o germinal. No obstante, la manipulación genética germinal, aunque se lleve a cabo con un propósito terapéutico, es una conducta prohibida en nuestro ordenamiento por el Convenio de Biomedicina y por la Ley 14/2007, de Investigación Biomédica, que la recoge como infracción muy grave: "La realización de cualquier intervención dirigida a la introducción de una modificación en el genoma de la descendencia" (artículo 74.2 C.a).

› Conclusiones

La discusión sobre los intereses y derechos implicados en la manipulación genética se ha abordado desde un plano filosófico y jurídico, y se enfrenta a cuestiones conceptuales muy complejas, como la noción de salud o de la naturaleza de la especie humana.

Más allá de la discusión doctrinal, las posturas institucionales son prácticamente unánimes en relación con la prohibición de la manipulación genética no terapéutica.

Recientemente, se ha planteado abrir un debate sobre la permisibilidad de la manipulación genética, incluso en línea germinal, si el objetivo es terapéutico, si bien no se debería perder de vista la relevancia que en este campo tiene de la aplicación del principio de precaución.

› Bibliografía

1. Macip S. ¿Debemos poner límites a la edición genética? El estado de la cuestión en el ámbito científico. En: CRISPR... ¿Debemos poner límites a la edición genética? Cuadernos de la Fundació Víctor Grífols i Lucas; 2017. pp. 35-45. Disponible en: https://www.fundaciogrifols.org/documents/4662337/36081334/q45/3d242db9-f9b4-42ac-8827-1fb9d46d8860.
2. De Miguel Beriain I, Armaza Armaza E. Un análisis ético de las nuevas tecnologías de edición genética: el CRIS PR-Cas9 a debate. Anales de la Cátedra Francisco Suárez. 2018;52:179-200.
3. Savulescu J, Singer P. An ethical pathway for gene editing. Bioethics. 2019;33(2):221-2.
4. Comité de Bioética de España. Declaración sobre la edición genómica en humanos, de 16 enero 2019. Disponible en: http://assets.comitedebioetica.es/files/documentacion/es/CBE%20Declaracion%20sobre%20edicion%20genomica%20en%20humanos.pdf.
5. Romeo Malanda S. Intervenciones genéticas sobre el ser humano y Derecho Penal. Granada: Comares; 2006.

6. Nuffield Council of Bioethics. Genome editing and human reproduction: social and ethical issues. 2018. Disponible en: http://nuffieldbioethics.org/project/genome-editing-human-reproduction.
7. German Ethics Council. Opinion Intervening in the Human Germline. 2019. Disponible en: https://www.ethikrat.org/fileadmin/Publikationen/Stellungnahmen/englisch/opinion-intervening-in-the-human-germline-summary.pdf.
8. Romeo Casabona C. El principio de precaución en las actividades de riesgo. Cuadernos de Derecho Judicial. 2002;3:13-60.
9. Comunicación [COM(2000) 1 final] sobre el recurso al principio de precaución. Disponible en: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=LEGISSUM:l32042.
10. Explanatory Report to the Convention for the protection of Human Rights and Dignity of the Human Being with regard to the Application of Biology and Medicine: Convention on Human Rights and Biomedicine. 1997. Disponible en: https://rm.coe.int/16800ccde5.
11. European Group on Ethics in Science and New Technologies. Statement on Gene Editing. 2019. Disponible en: https://ec.europa.eu/research/ege/pdf/gene_editing_ege_statement.pdf.
12. So D, Kleiderman E, Touré SB, Joly Y. Disease and the definition of genetic enhancement. Frontiers in genetics. 2017;8(40) 2017.

Este trabajo se ha realizado en el marco del proyecto: PMP15/00007 *Functional and Clinical Impact of Genomic Analysis in CLL*, integrado en el Plan Estatal de I+D+I y cofinanciado por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)-Subdirección General de Evaluación y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER-"Una manera de Hacer Europa").

GRUPO ESPAÑOL DE CITOLOGÍA HEMATOLÓGICA (GECH). CASOS CLÍNICOS CITOLÓGICOS

Coordinadores: **Dra. Esperanza Tuset Andújar.** Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta.
Dr. José Tomás Navarro Ferrando.
Hospital Universitario Germans Trias i Pujol-ICO. Badalona, Barcelona

Un año más y como es tradición, el GECH presenta su simposio en el Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia, que este año 2019 tiene como sede la ciudad de Valencia. Como es habitual se presentan seis casos clínico-citológicos, los cuales han sido seleccionados de forma anónima, posteriormente fueron valorados en la reunión interanual del GECH, también de forma anónima. El hecho que su selección haya sido anónima garantiza la igualdad de opciones de todos los centros a nivel nacional. Para la selección de los casos se ha tenido en cuenta tanto su interés científico como su carácter práctico y su valor docente

Patricia Carrascosa (Hospital General Universitario de Castellón) nos expone un caso de un varón con blastos en sangre periférica de aspecto linfoide en el que se muestra la importancia de la orientación diagnóstica morfológica, así como su posterior estudio secuencial e integrado con el resto de técnicas. Sin olvidar la importancia de un correcto diagnóstico diferencial, no siempre sencillo en las neoplasias linfoides.

Sonia Daza Pozo (Hospital Virgen de la Salud de Toledo) nos expone un caso de un varón que a partir de una retinopatía hemorrágica se diagnostica de una leucemia linfoblástica con reordenamiento de *KMT2A* y cuya evolución al final del tratamiento de inducción nos sorprenderá.

Concepción Prats Martin (Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla) nos expone un caso de una mujer que a raíz de una lumbalgia se le detecta una bicitopenia. Su estudio les lleva al diagnóstico de una patología infrecuente en la que la citomorfología es fundamental, como se muestra en las imágenes, junto al immunofenotipo. Convirtiendo, en este caso, a ambas técnicas en herramientas imprescindibles del diagnóstico, mientras el estudio genético corrobora su diagnóstico diferencial.

Carlos de Miguel Sánchez (Hospital Universitario de Araba) nos expone un caso de un varón con hiperleucocitosis a expensas de linfocitos, en los que su estudio citomorfológico nuevamente vuelve a ser decisivo para su correcta orientación diagnóstica, pese al resultado inicial del immunofenotipo. Un caso, que a pesar de su aparente sencillez, requirió de la integración de la clínica, la morfología, el fenotipo y la genética; que una vez más muestran la relevancia del diagnóstico integrado.

Carlos Bravo Pérez (Hospital Universitario Morales Meseguer de Murcia) expone el caso de una mujer con historia previa de linfoma folicular con una evolución atípica, cuyo estudio histológico y genético plantea dudas a la hora de establecer un diagnóstico definitivo, según los criterios de la clasificación de la OMS del 2017. Lo cual muestra la necesidad de seguir investigando en el ámbito de la fisiopatogenia en la evolución de las neoplasias linfoides.

Laura Lo Riso (Hospital Universitario Son Espases de Palma de Mallorca) presenta un caso de un niño con una hiperlecucocitosis en el que para llegar al diagnóstico final, los datos morfológicos son cruciales, y en el que el estudio molecular fue muy útil para afianzar un diagnóstico muy poco frecuente en la edad pediátrica.

Como siempre deseamos que cada uno de estos casos sea de interés para los miembros de la SEHH y los asistentes al simposio, en los que esperamos se susciten dudas y un debate que nos enriquezca a todos.

Caso 1. Anemia con blastos en sangre periférica

Patricia Carrascosa Mastell, M.ª Dolores Linares Latorre, Teresa Martínez Gaspar, Manuel Fernández-Delgado Momparler, Diana Margarita Trejos Carvajal, Juana M.ª Clavel Pía, Luis Serrano Picazo, Carolina Cañigral Ortiz, Aima Lancharro Anchel, Adriana Gascón Buj, Nuria Claros Barrachina, Raimundo García Boyero, Guillermo Cañigral Ferrando

Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital General Universitario de Castellón

› Motivo de consulta

Se trata de un varón de 66 años que acudió a su centro de atención primaria por clínica de 20 días de pérdida de apetito con saciedad precoz y mialgias, sensación de distermia sin fiebre objetivada y dolor abdominal en el hipogastrio.

› Historia clínica

El paciente no presentaba antecedentes personales de interés, salvo hiperplasia benigna de próstata y una fístula anal intervenida. Como hábitos tóxicos, era fumador de 4-5 cigarrillos al día.

› Pruebas complementarias

• **Hemograma**: hemoglobina (Hb) de 10,6 g/dL, volumen corpuscular medio (VCM) de 86,6 fL. Leucocitos: 9,28 × 10^9/L; fórmula automática: neutrófilos de 2,49 × 10^9/L, linfocitos de 3,60 × 10^9/L y LUC de 2,540 × 10^9/L; plaquetas 101 × 10^9/L.

• En el **frotis de la sangre periférica** se observaba un 11% de células de aspecto blástico de mediano a gran tamaño, de hábito linfoide con escaso citoplasma basófilo en ocasiones vacuolado y un núcleo de contorno irregular, hendido en algunos elementos, cromatina laxa y visualización de uno o varios nucleolos (Figura 1).

• **Pruebas de hemostasia**: tiempo de protrombina (TP) 11'', IQ 88%, INR 1,10, tiempo tromboplastina parcial activado (TTPa) 25,5'' y fibrinógeno 441 mg/dL.

• **Bioquímica plasmática:** únicamente destacaba una LDH de 1.430 UI/L (230-460 UI/L).

• La **tomografía axial computarizada (TAC) toracoabdominopélvica** mostraba un cuadro poliadenopático supra- e infradiafragmático con adenopatías que no solían superar los 2 cm de eje máximo. Además, se observaba una hepatomegalia y una esplenomegalia de 25 cm.

• Estudio de médula ósea: el aspirado medular no fue valorable por no obtenerse grumo, por lo que se realizó una biopsia de médula ósea. En el estudio citomorfológico de la impronta a pequeño aumento se observaban agrupaciones de células de aspecto blástico con elevada relación núcleo/citoplasma que, a mayor aumento, correspondían a blastos de hábito linfoide con escaso citoplasma basófilo, que en ocasiones eran vacuolados con núcleo irregular de cromatina laxa y uno o varios nucleolos (Figura 2).

• Estudio de inmunofenotipo: para el estudio de citometría de flujo se emplearon los paneles de EuroFlow, con muestras de sangre periférica. Se inició el estudio con el panel ALOT por sospecha de leucemia aguda (Figura 3), que mostraba una población del 24% de células CD34 negativas, que expresaban marcadores de célula B (CD19+ y CD79b+) en ausencia de marcadores de línea linfoide T y línea mieloide. Por ello, se realizó el panel de leucemia aguda linfoblástica B, en el que se observaba que estas células eran negativas para marcadores de inmadurez y expresaban CD20 y cyIgM, por lo que se amplió el estudio con el panel de neoplasias de células B maduras (Figura 4), en el cual la población de células patológicas expresaba CD5 y presentaba clonalidad kappa junto a expresión brillante de sIgM, mientras que eran negativas para CD10, CD200 y CD23.

• Estudio de hibridación *in situ* fluorescente (FISH): ante la sospecha diagnóstica de neoplasia de células B maduras se realizó el estudio de FISH para c-MYC

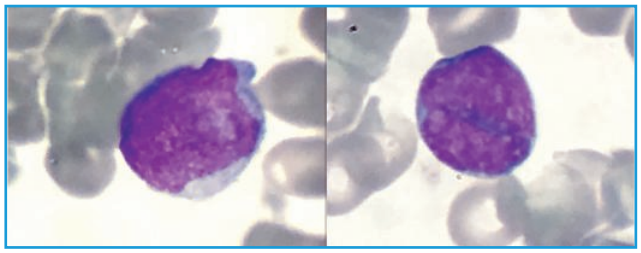


Figura 1. Sangre periférica (MGG) × 1.000. Blastos de mediano a gran tamaño de aspecto linfoblástico.

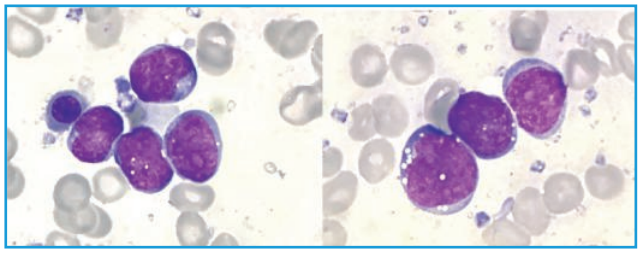


Figura 2. Impronta médula ósea (MGG) × 1.000. Blastos de gran tamaño de hábito linfoide.

(sonda *break-apart*), BCL2, BCL6 y BCL1, detectándose solo la presencia del reordenamiento para c-MYC (Figuras 5 y 6).

• Histología de médula ósea: el estudio histológico de la biopsia medular confirma la infiltración nodular-intersticial del 70% por linfocitos atípicos maduros de línea B que expresaban por inmunohistoquímica c-MYC y BCL2, además del marcador de proliferación Ki67 del 100%. Por lo que se concluyó que se trataba de una infiltración por linfoma de células del manto (LCM) en su variante blástica (Figura 7).

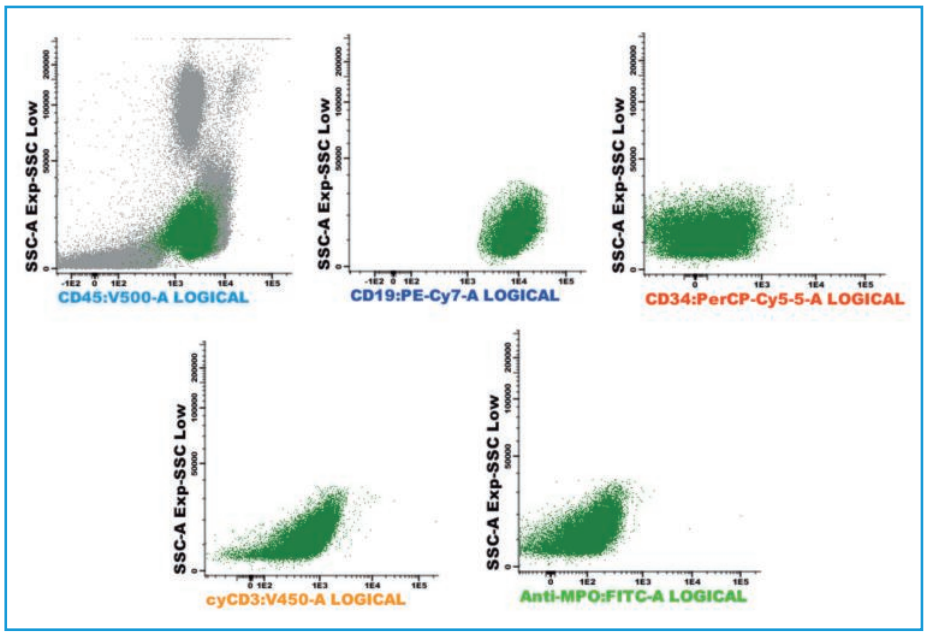


Figura 3. ALOT (EuroFlow) (sangre periférica): 24% de células localizadas en el área blástica que muestran positividad para marcadores de célula B (CD19+) y negatividad para marcadores de célula T y mieloide (cyCD3 y MPO–), así como CD34–.

› Diagnóstico definitivo

En resumen y tras la integración de todos los estudios, se trataba de un LCM, variante blástica con reordenamiento c-myc, estadio IV y MIPI (Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index) de alto riesgo (*score* de 6).

› Evolución y tratamiento

El esquema terapéutico empleado en primera línea incluyó 6 ciclos de R-CHOP y R-DHAP alternantes, y se planteó la realización posterior de un autotrasplante de progenitores hematopoyéticos y mantenimiento con rituximab. Se completó el tratamiento con profilaxis para el sistema nervioso central (SNC) administrando quimioterapia intratecal. Tras finalizar el sexto ciclo, el paciente acudió a urgencias por un cuadro de debilidad en ambas extremidades inferiores y un episodio de diplopía autolimitada, por lo que el paciente ingresa para su estudio, realizándose las siguientes pruebas complementarias:

• **TAC craneal**: sin hallazgos de patología isquémica o hemorrágica aguda.

• **Estudio de líquido cefalorraquídeo (LCR)**: tanto por citometría como por citología y en varias punciones se descartó la presencia de infiltración del SNC por linfoma.

• **Resonancia magnética nuclear (RMN)**: se objetivó una zona de compromiso extraaxial en la vertiente medial de la fosa media izquierda de tipo infiltrativo de 25 mm de extensión, caudal al seno cavernoso, que afectaba al *cavum* de Meckel con captación de contraste.

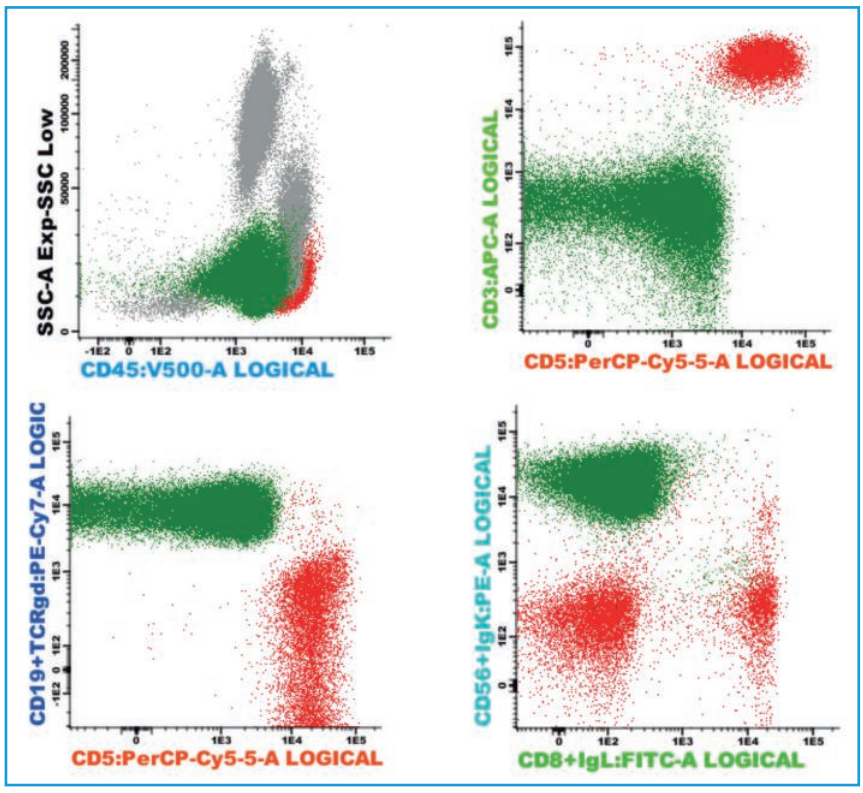


Figura 4. LST (EuroFlow) (sangre periférica): 37% de células localizadas en el área blástica que muestran CD5+ y monoclonalidad kappa.

• **La tomografía por emisión de positrones (PET)-TAC** reveló una infiltración tumoral nerviosa (temporal y retoorbitarias izquierdas, cérvico-dorsal derecha, intramedular y en raíces sacras) y ósea (al menos en húmero, 7.ª costilla y fémur derechos, y sacro), además de una adenopatía mesentérica probablemente tumoral.

• **Estudio de médula ósea**: tanto el aspirado como la biopsia no mostraron evidencia de infiltración por linfoma.

Durante el ingreso, además de la focalidad neurológica mencionada, el paciente desarrolló una parálisis del III par craneal, por lo que se decide iniciar tratamiento con metotrexato a altas dosis y continuar con ibrutinib ante la alta sospecha diagnóstica de progresión de la enfermedad tanto en el SNC como sistémica, a pesar de no disponer de confirmación histológica. A los 12 días de iniciar el ibrutinib, el paciente consultó nuevamente por empeoramiento del estado general con dolor en hemicara izquierda, sobre todo mandibular y

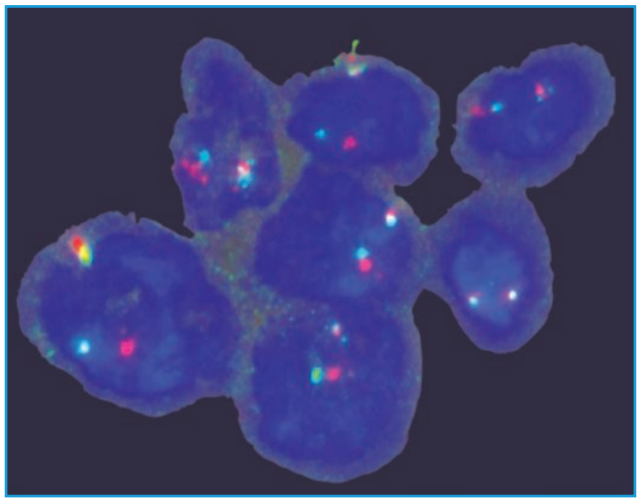


Figura 5. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH), c-myc (*break-apart*). C-myc reordenado.

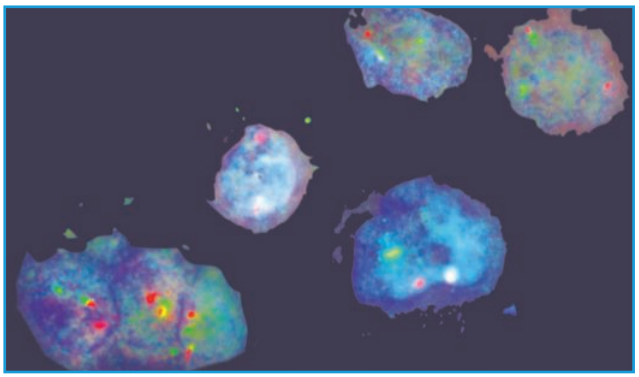


Figura 6. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH), Bcl1 (*break-apart*). Bcl1 reordenado.

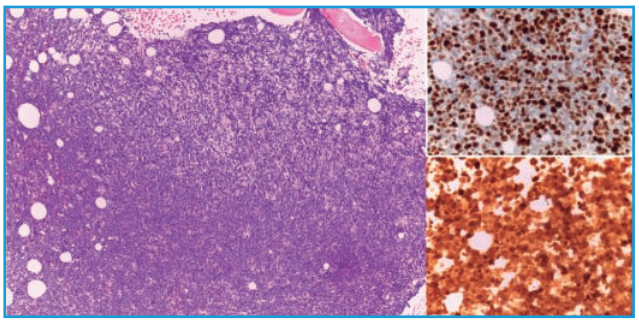


Figura 7. Médula ósea. Infiltración nódulo-intersticial por linfoma de células del manto variante blástica con expresión de c-myc.

en el hombro izquierdo; y una semana más tarde presentó un cuadro de deterioro del nivel de conciencia con mal estado general y arreactividad, rigidez nucal y clínica comicial, así como deterioro respiratorio, siendo *exitus* a los pocos días.

› Discusión

El LCM es una neoplasia de células B maduras compuesto habitualmente por linfocitos de pequeño a mediano tamaño monomórficos y de núcleo con contorno irregular, en el que en más del 95% de los casos se detecta el oncogén de la ciclina D1. Habitualmente, conforman entre el 3 y el 10% de los linfomas no Hodgkin y se suelen presentar al diagnóstico en estadios avanzados (III-IV) con adenopatías, esplenomegalia y afectación medular, incluso leucemización.

Morfológicamente, se distinguen 2 variantes agresivas: la blástica, con células que asemejan linfoblastos con cromatina laxa y una alta relación núcleo/citoplasma; y la pleomórfica, con linfocitos grandes con núcleo oval e irregular, citoplasma pálido y frecuentemente con nucleolo marcado. Las otras 2 variantes morfológicas descritas son la de célula pequeña, con linfocitos muy parecidos a los de la leucemia linfática crónica, y la variante zona marginal-*like*, que asemeja células propias de la zona marginal o de aspecto más monocitoide.

El estudio inmunohistoquímico muestra positividad sIgM+, Bcl2+, CD5+, CD10–, Bcl6– y ciclina D1+. A nivel genético, es característica la presencia de la translocación t(11;14)(q13;q32) entre los genes IgH y CCND1. En algunas formas blásticas y de forma poco habitual se puede observar c-MYC reordenado, siendo la t(8;14)(q24;q32) la más frecuentemente asociada; estos casos suelen comportar una mayor agresividad.

El LCM variante blástica conforma el 30% de los LCM, suele presentar un elevado índice de proliferación (expresión de Ki67) y tiene un pronóstico desfavorable, siendo frecuente que se diagnostique al inicio de la enfermedad, a diferencia de la transformación blástica de la forma clásica. Su presentación clínica se asemeja a la forma clásica, aunque los estudios comparativos son escasos. Predominantemente, afecta a pacientes varones con una media de edad de presentación de 60 años.

Suele presentar una alta expresión de c-MYC y, de forma menos frecuente, amplificaciones y translocaciones de dicho gen; suele ser relativamente frecuente su negatividad para CD5 con coexpresión de CD20 y CCND1. No hay alteraciones genéticas patognomónicas que se den en la variante blástica que excluyan la variante clásica y la mayoría de las alteraciones moleculares se ven aumentadas en la variante blástica pero también se pueden observan en el manto clásico muy proliferativo, aunque se ha descrito con relativa frecuencia un aumento de aberrancias cromosómicas (deleciones y pérdidas de p16 y p21) y mutaciones en genes implicados en el ciclo celular (*ATM*, *TP53*, *ciclina-D1*, proteína antiapoptótica *BIRC3* y receptores *toll*, *UBR5*) así como mutaciones en genes implicados en la modificación de la cromatina (*WHSC1*, *MLL2*, *MEF2B*), *NOTCH1* y *NOTCH2*.

En cuanto al compromiso del SNC, un estudio retrospectivo de la European MCL Network estimó en un 4,1% su afectación (0,9% al diagnóstico), diferenciado en la variante blástica una mayor tasa de infiltración (28 *vs.* 10%; p > 0,0001). En otra serie, 33 de 608 LCM (5,4%) presentaban afectación del SNC y, de nuevo, uno de los factores de riesgo fue la variante blástica. Por ello, la profilaxis del SNC se debe considerar especialmente en dicha variante, aunque no hay datos sobre la eficacia de la profilaxis intratecal ni de la administración sistémica de metotrexato o altas dosis de citarabina en estos casos.

El linfoma del manto variedad blástica sigue siendo un reto tanto diagnóstico como terapéutico. Debido al curso clínico agresivo que presenta se recomiendan esquemas de tratamiento que contengan citarabina y el trasplante autólogo como consolidación. Sin embargo, los resultados de supervivencia a largo plazo son poco esperanzadores, por lo que han de considerarse otras estrategias (inmunoterapia, inclusión en ensayos clínicos), así como la realización de trasplante alogénico en fases iniciales en pacientes jóvenes.

› Conclusiones

• En ocasiones el LCM se encuentra al diagnóstico leucemizado, por lo que es necesaria una correcta valoración morfológica de la sangre periférica, así como complementar el estudio de la misma con inmunofenotipo y genética. Sin olvidar las posibles variantes morfológicas descritas en este tipo de linfoma. Por ello, es importante realizar un diagnóstico integrado (cito-

morfología, citometría, citogenética y anatomía patológica) y correlacionar bien la información que cada técnica nos aporta.

• Ante casos de LCM con morfología blástica se debe descartar una neoplasia de células B precursoras.

• Aunque típicamente el reordenamiento de *c-MYC* se asocia al linfoma de Burkitt, hay otras patologías linfoides que lo presentan, por lo que es muy importante un correcto diagnóstico diferencial.

• El caso expuesto sirve como ejemplo de la complejidad de las patologías hematológicas y de la necesidad de continuar revalorando su clasificación, así como nuevas estrategias terapéuticas que ayuden a mejorar la respuesta y el pronóstico de muchos pacientes.

› Bibliografía

- Chea CY, Seymour JF, Wang ML. Mantle cell lymphoma. J Clin Oncol. 2016;34:1256 -69.
- Dreyling M, Klapper W, Rule S. Blastoid and pleomorphic mantle cell lymphoma: still a diagnostic and therapeutic challenge! Blood. 2018 Dec 27;132(26):2722-9.
- Hu Z, Medeiros LJ, Chen Z, Chen W, Li S, Konopley SN, et al. Mantle cell lymphoma with MYC rearrangement. A report of 17 cases. Am J Surg Pathol. 2017;41(2): 216-24.
- Sander B, Quintanilla-Martínez L, Ott G, Xerri L, Kuzu I, Chan JKC, et al. Mantle cell lymphoma - a spectrum from indolent to aggressive disease. Virchows Arch. 2016 Mar;468(3):245-57.
- Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic Tissues. Revised 4th edition. WHO; 2017. pp. 286-90.

Caso 2. Varón con hiperleucocitosis y visión borrosa

Sonia Daza Pozo[1], M.ª de la O Abío Calvete[1], M.ª Carmen Toledo Ruiz[1], Laura Parrilla Navamuel[1], Karen Gabriela Albiño Salazar[1], Sara Moreno Ramírez[1], Andrea Rodríguez Hidalgo[1], Noelia Rollón Simón[1], Esther Botón Contreras[1], Elisa de Diego Vázquez[1], Ana Muñoz Gama[1], Marisol Mateo Guerrero[2], José Agustín Rodríguez Alén[1], Jorge Cuesta Tovar[1]

[1] Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Virgen de la Salud, Toledo; [2] Servicio de Genética, Hospital Virgen de la Salud, Toledo

› Motivo de consulta

Visión borrosa y fiebre.

› Historia clínica

Se trata de un varón de 51 años, natural de Rumanía, sin antecedentes personales de interés, que acudió al Servicio de Urgencias del hospital para la valoración de un cuadro de visión borrosa y pérdida de agudeza visual de 24 horas de evolución. Refería asimismo astenia, anorexia y fiebre sin foco desde hacía 3 días.

› Exploración física

Auscultación cardiaca y pulmonar normales. Abdomen blando y depresible sin visceromegalias. No se palpaban adenopatías a ningún nivel. En la exploración oftalmológica se observaban datos de retinopatía hemorrágica bilateral con papiledema en el ojo izquierdo.

› Pruebas complementarias

• Hemograma: intensa anemia normocítica normocrómica con hemoglobina de 6,1 g/dL, volumen corpuscular medio (VCM) de 95 fL, trombocitopenia de 82 × 10^9/L y leucocitosis de 270 × 10^9/L.

• Estudio de coagulación: tiempo de protrombina 67% (70-150), tiempo de tromboplastina parcial activado 27,2 s (20-38), fibrinógeno de Clauss 103 mg/dL, dímero D 34.000 ng/mL (280-500).

• Bioquímica: creatinina 0,88 mg/dL (0,50-1,20), urea 48 mg/dL (10-50), sodio 140 mEq/L (136-145), potasio 4,65 mEq/L (3,30-5,10), fósforo 4,2 mg/dL (2,7-4,5), GOT (AST) 26 U/L (5-37), GPT (ALT) 15 U/L (5-40), GGT 49 U/L (10-66), LDH sérica 2.480 U/L (230-480), ácido úrico 9,4 mg/dL (2,4-7).

• Frotis de sangre periférica: presencia de 80% de blastos de mediano tamaño con cromatina laxa con 1-2 nucléolos y escaso citoplasma agranular con alguna vacuola citoplasmática y sin bastones de Auer. Serie roja y neutrófilos presentes sin alteraciones morfológicas de interés (Figura 1).

• Mielograma: médula ósea hipercelular, más del 90% de la celularidad total correspondía a células blásticas (Figura 2). Estas células eran de mediano tamaño, con alta relación núcleo/citoplasma, cromatina de aspecto semimaduro, con presencia de 1-2 nucléolos y escaso citoplasma con vacuolas citoplasmáticas ocasionales. El citoplasma de los blastos era agranular y sin presencia de bastones de Auer (Figura 3).

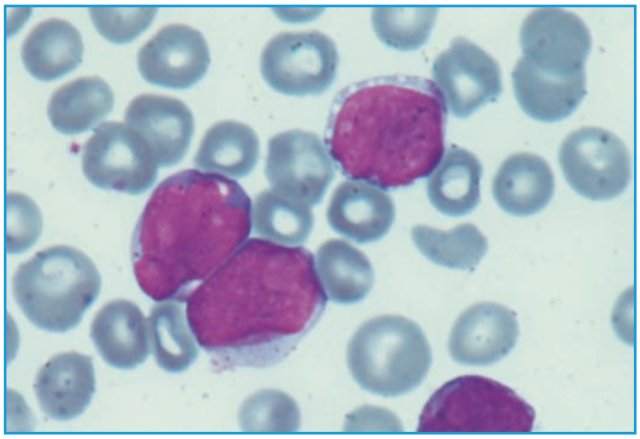


Figura 1. Sangre periférica. Blastos de mediano tamaño, alta relación núcleo/citoplasma, cromatina fina con algún nucléolo y citoplasma escaso con alguna vacuola intracitoplasmática. Tinción de May-Grünwald-Giemsa (× 100).

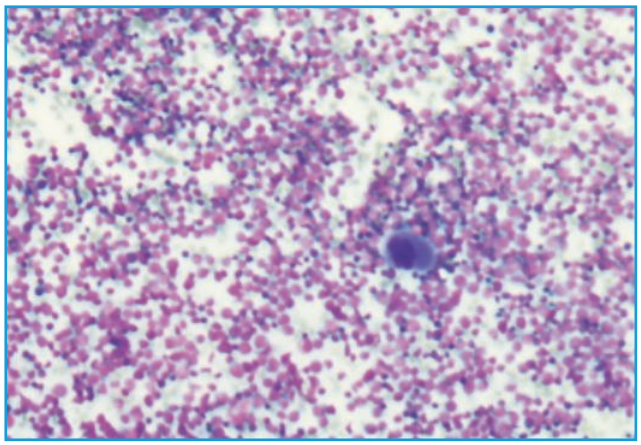


Figura 2. Médula ósea. Infiltración medular por población monomorfa de células blásticas. Tinción de May-Grünwald-Giemsa (× 20).

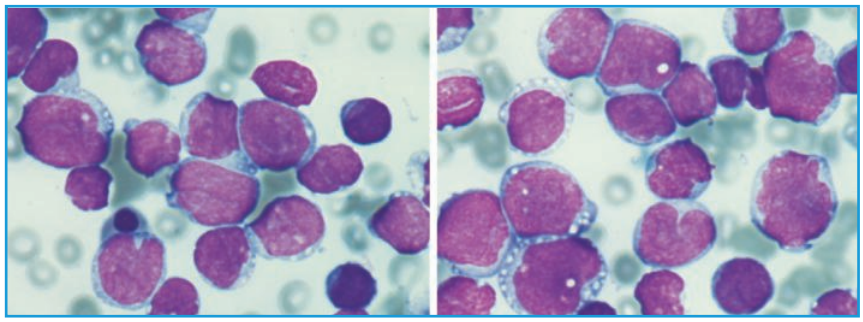


Figura 3. Médula ósea. Blastos de mediano/gran tamaño con núcleo de cromatina laxa y nucléolos visibles, así como escaso citoplasma con presencia de algunas vacuolas citoplasmáticas. Tinción de May-Grünwald-Giemsa (× 100).

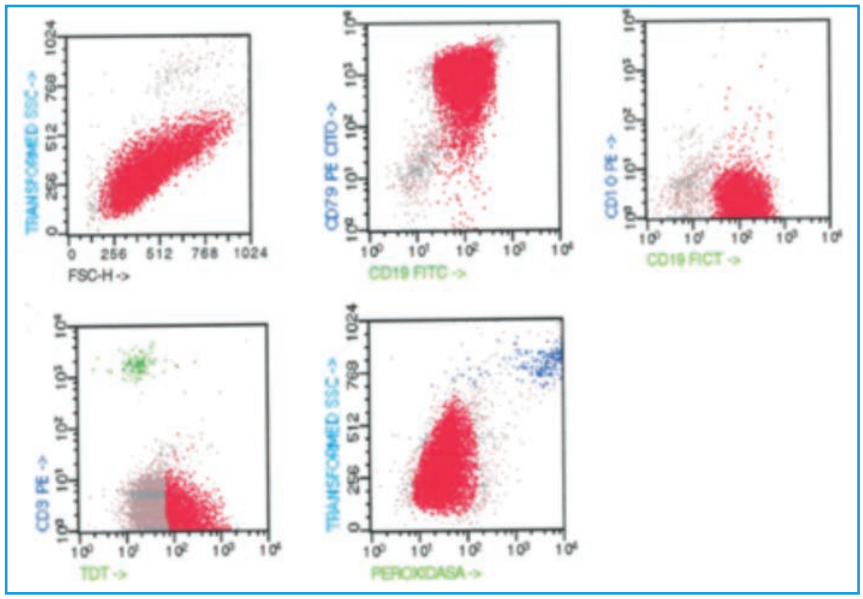


Figura 4. Citometría de flujo de médula ósea al diagnóstico: población leucémica (color rojo) con positividad para los marcadores CD79a, CD19 y TdT (30%), y negativa para los antígenos CD10 y MPO.

• Citometría de flujo de médula ósea. La población patológica tenía positividad para antígenos linfoides B: CD19, CD79a citoplasmático, CD22 citoplasmático; y positividad para TDT en el 30% de la población neoplásica. Toda la población era positiva para CD38. Por el contrario, presentaba negatividad para los antígenos CD10 y CD20, así como para marcadores linfoides T (CD3, CD7, CD4 y CD8) y marcadores mieloides (mieloperoxidasa, CD13, CD33) (Figura 4).

• Estudio citogenético de médula ósea con técnicas de banda GTG: en 17 de las 20 metafases analizadas se observó un cariotipo 46 XY con una alteración clonal que consistía en una translocación recíproca t(4;11) entre las citobandas 4q21 y 11q23 (Figura 5).

• Estudio de citogenética molecular (hibridación *in situ* fluorescente –FISH–) de médula ósea sobre núcleos interfásicos: reordenamiento del gen *KMT2A*.

• Biología molecular de médula ósea: reordenamiento monoclonal del gen *IGH*.

› Diagnóstico

Leucemia linfoblástica aguda (LLA) con t(4;11q23) con reordenamiento del gen *KMT2A*.

› Tratamiento y evolución

Tras el diagnóstico de LLA, se inició tratamiento de prefase con hidroxiurea y dexametasona con objetivo citorreductor y, posteriormente, tratamiento específico con el protocolo de PETHEMA para LAL AR2011 (prednisona, vincristina, daunorubicina y PEG-asparaginasa).

Como complicaciones durante la aplasia posquimioterapia, presentó un episodio de celulitis en el miembro inferior derecho y una neumonía bilobular, e insuficiencia cardiaca congestiva que precisó el ingreso en la Unidad de Vigilancia Intensiva durante 5 días.

En el día +38 postinducción, tras la recuperación de la aplasia posqui-

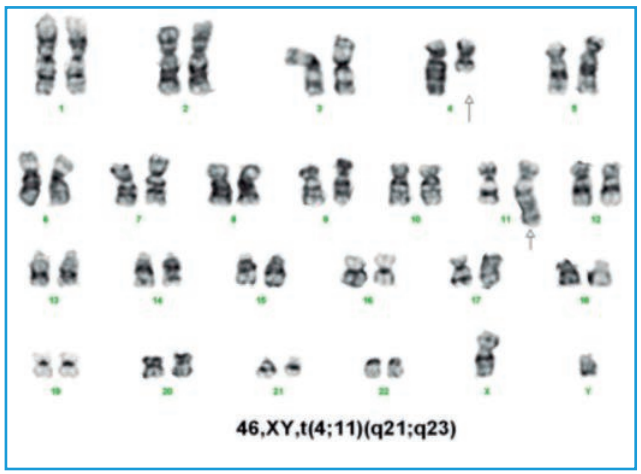


Figura 5. Cariotipo de médula ósea al diagnóstico: 46,XY,t(4;11)(q21;q23) [17]/46,XY [3]. La translocación t(4;11) está señalada con flechas.

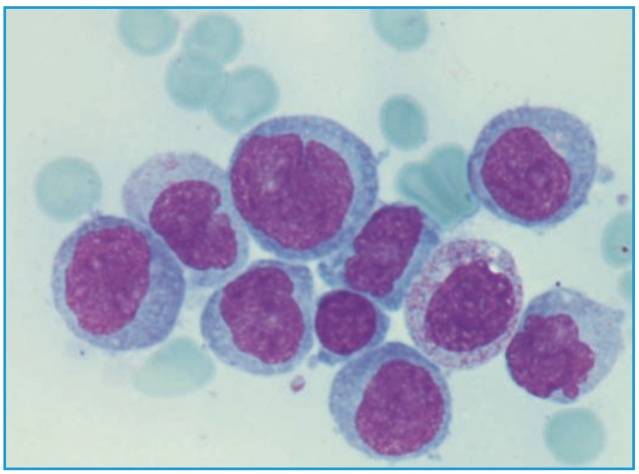


Figura 6. Médula ósea de revaluación en el día +38. Células blásticas de mediano/gran tamaño con núcleo con cromatina fina con 1 nucléolo y citoplasma basófilo sin granulación citoplasmática. Tinción de May-Grünwald-Giemsa (× 100).

mioterapia, se realizó el estudio de revaluación de la enfermedad, con las siguientes pruebas complementarias:

• Mielograma: médula ósea hipercelular con presencia de un 50% de blastos de gran tamaño con cromatina fina y nucléolo visible, citoplasma basófilo con fina granulación, sin bastones de Auer y con alguna vacuola citoplasmática. Estas células tenían un aspecto monocitoide y con una morfología diferente a las del diagnóstico (Figura 6).

• Citometría de flujo de médula ósea: se evidenció un 52% de la población total con marcadores de línea monocítica (CD64+ CD14– CD33+ HLA-DR+) y no se detectó ninguna población similar a la del diagnóstico, cuyo fenotipo era de línea linfoide B (Figura 7).

• Estudio citogenético de médula ósea: se siguió observando la translocación t(4;11)(q21;q23), asociando en 7 de las metafases analizadas trisomías en los cromosomas 8 y 12 (Figura 8).

• Biología molecular de médula ósea: en esta ocasión, el reordenamiento del gen *IGH* fue policlonal y no se detectaron mutaciones en los genes *NPM1* y *FLT3*.

Ante las diferencias detectadas respecto al diagnóstico inicial, se decidió repetir el estudio medular unos días después para confirmar los resultados. Tanto en la morfología como en la citometría de flujo se obtuvieron los mismos datos descritos en la revaluación. En cuanto a la citogenética, seguía presentando la translocación t(4;11)(q21;q23) y además asociaba un cariotipo tetraploide en 10 de las metafases analizadas (Figura 9).

En este momento, se decidió descartar la presencia de trisomía de los cromosomas 8 y 12 en la médula ósea inicial mediante FISH centromérica para estos cromosomas y descartar así que estuvieran presentes

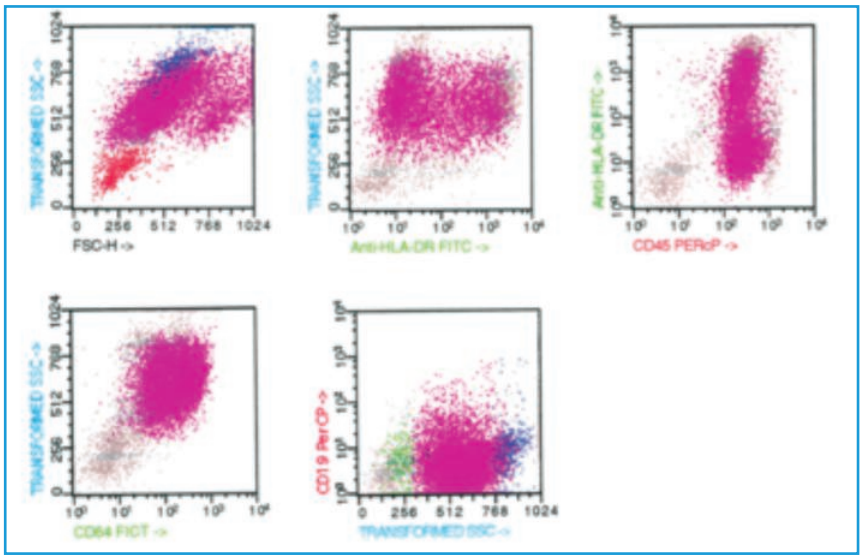


Figura 7. Estudio de citometría de flujo en la médula ósea de revaluación: 52% de la población total (color rosa) con tamaño y morfología diferente a la del diagnóstico y con positividad para los antígenos CD64 y HLA-DR y negativa para CD19.

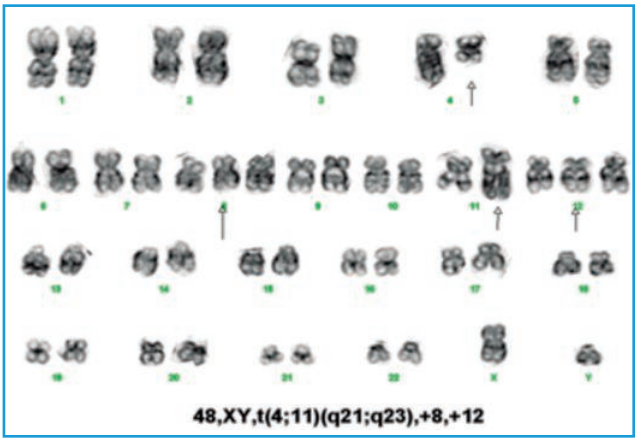


Figura 8. Cariotipo de la médula ósea de revaluación: 46,XY t(4;11)(q21;q23) [3]/48,XY,ídem,+8,+12 [7]/46,XY [12].

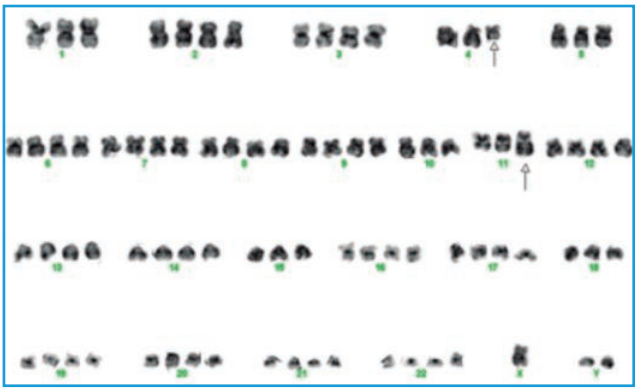


Figura 9. Cariotipo de médula ósea en el segundo estudio de revaluación: cariotipo tetraploide con 82 cromosomas con persistencia de la translocación entre los cromosomas 4 y 11 (flechas).

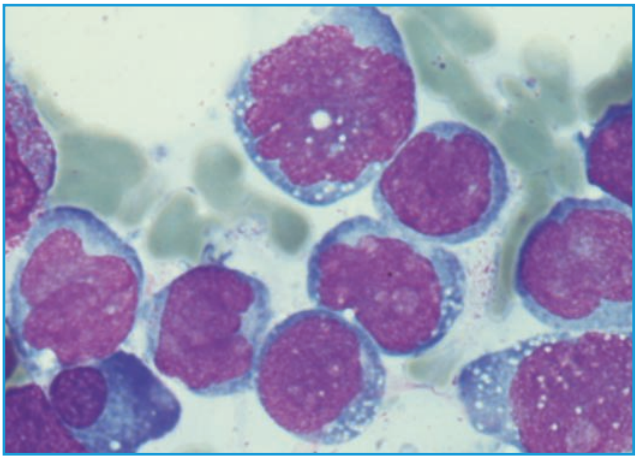


Figura 10. Médula ósea tras la reinducción. Blastos de gran tamaño con núcleo irregular, cromatina laxa, presencia de 1-2 nucléolos y citoplasma basófilo con presencia de vacuolas intracitoplasmáticas en algunos de los blastos. Tinción de May-Grünwald-Giemsa (× 100).

desde el inicio en la población patológica. Dicho estudio resultó negativo.

Asimismo, también desde el punto de vista citológico e inmunofenotípico se compararon ambos estudios y se descartó la presencia de 2 poblaciones patológicas diferentes al diagnóstico, confirmando que el estudio inicial fue correcto y que en el momento actual el paciente presentaba un cambio de línea en la evolución de la enfermedad. Por lo tanto, nos encontrábamos ante un cambio inmunofenotípico de LLA a leucemia mieloide aguda (LMA) de tipo monoblástico.

Ante estos hallazgos, se procedió a cambiar la línea de tratamiento y se inició tratamiento quimioterápico con esquema FLAG-Ida (fludarabina, citarabina, prednisona, G-CSF, idarubicina).

El paciente presentó de nuevo graves complicaciones infecciosas con bacteriemia por *Pseudomona aeruginosa*, requiriendo de un segundo ingreso en la Unidad de Vigilancia Intensiva por inestabilidad hemodinámica y compromiso respiratorio.

Una vez resuelto el cuadro infeccioso, en el día +28 del ciclo de reinducción, se realizó un nuevo aspirado medular en el que se detectó la persistencia de la enfermedad con una infiltración del 40-60% de blastos de aspecto monocítico similares a los del estudio de revaluación postinducción (Figura 10). La citometría de flujo realizada en médula ósea no presentó diferencias respecto al estudio previo y, lamentablemente, no se pudo realizar el estudio citogenético por problemas logísticos.

Ante estos hallazgos y dado el mal pronóstico a corto plazo, el paciente decidió solicitar el alta hospitalaria para trasladarse a su país de origen.

› Discusión

Nos encontramos ante un caso de leucemia con una evolución muy singular. El estudio inicial fue compatible con el diagnóstico de una LLA con t(4;11) y reordenamiento de gen *KMT2A*[1]. La t(4;11) se encuentra en el 5-10% de las LLA del adulto, siendo esta translocación más frecuente en la población infantil. El paciente presentaba varias características típicas de esta entidad, como son la hiperleucocitosis, la coagulopatía y una evolución agresiva y de muy mal pronóstico. Estas leucemias suelen proceder de una célula precursora B inmadura y, en relación con ello, presentar marcadores inmunofenotípicos inmaduros,

como la negatividad para CD10 y CD20. Algunas pueden coexpresar algunos marcadores mieloides como CD15 y CD65, sin cumplir criterios de leucemia aguda bifenotípica. Parece que esta coexpresión antigénica podría estar en relación con el origen inmaduro de la célula leucémica inicial[2-3].

En este caso, observamos que, tras el tratamiento inicial, el paciente presentó un cambio de línea linfoide a mieloide, encontrando la primera pista de dicho cambio en la detección de claras diferencias en la morfología. La morfología inicial correspondía a blastos de aspecto linfoide, a diferencia de la morfología de aspecto monocitoide observada en los aspirados de revaluación de la enfermedad.

En el estudio de citometría de flujo, las poblaciones patológicas del diagnóstico y la revaluación presentaban marcadores antigénicos de líneas diferentes. Por ello, volvimos a revaluar las adquisiciones de ambos estudios, sin encontrar población mieloide patológica al diagnóstico ni la población inicial de línea linfoide en los estudios de revaluación.

En el cariotipo, mantuvo en todo momento la translocación entre los cromosomas 4 y 11, pero presentando alteraciones clonales añadidas en la revaluación. La trisomía en los cromosomas 8 y 12, que habitualmente se suele observar con mayor frecuencia en patología mieloide, apoya la teoría del cambio a línea mieloide/monocítica. En cuanto a la detección de tetraploidía, es posible que esta alteración pudiese haber existido *in vivo* desde que se detectó el cambio de línea, pero que en el cultivo de las metafases del primer estudio de revaluación no llegasen a crecer o que no fuesen viables para el análisis.

Con todos los datos, se concluye que el caso aquí expuesto presentó un viraje de LLA a LMA de tipo monoblástico. Este raro comportamiento en la evolución de las leucemias se ha descrito en varios casos en la literatura, asociándose con la presencia de reordenamientos del gen *KMT2A* en algunos de ellos. En su mayoría el cambio de línea suele ser de línea linfoide a mieloide, como en el caso presentado, aunque también se han descrito casos en los que ocurre lo contrario[2].

Existen varias teorías en relación con este comportamiento. La mayoría se sustentan en la existencia de un precursor leucémico muy inmaduro con capacidad de diferenciación a ambas líneas, unido a otros factores[3]. En muchos casos, los desencadenantes para el cambio suelen estar en relación con el tratamiento específico de línea que elimina la población inicial y permite al precursor inmaduro expandir otra línea celular[4-6]. Para llegar a la conclusión de que se ha producido un cambio de línea de la población patológica se deben mantener las mismas alteraciones citogenéticas, como ocurre en el paciente presentado[7,8]. Este caso tiene como peculiaridad la aparición de trisomía en los cromosomas 8 y 12, que se ha considerado como una evolución clonal asociada al cambio de línea. Puesto que en todo momento se mantuvo la alteración citogenética inicial, consideramos que sigue cumpliendo los requisitos para mantener la teoría del cambio inmunofenotípico[9].

Este tipo de leucemia aguda presenta un pronóstico muy malo con una forma de presentación muy agresiva, tal y como ilustra este caso. Se han intentado establecer diferentes esquemas terapéuticos, incluso intensificación del tratamiento con alotrasplante de progenitores hematopoyéticos, sin obtener en la mayoría de los casos un claro aumento en la supervivencia global de estos pacientes[10].

› Conclusiones para recordar

- La LLA con reordenamiento de gen *KMT2A* es una entidad poco frecuente dentro de la población adulta.
- Este tipo de leucemia suele proceder de una célula precursora muy inmadura y en relación con la presencia de la mutación del gen *KMT2A* se han documentado casos de cambio inmunofenotípico más frecuentemente que en entidades similares a ella, pero sin esta mutación.
- El tratamiento con quimioterapia selectiva de línea puede desencadenar la expansión de otra línea celular neoplásica.
- Esta variedad presenta un pronóstico infausto que, a pesar de los cambios de línea de tratamiento, no ve mejorada su supervivencia global.
- La morfología nos puede dar la primera pista del cambio de línea, que se debe confirmar mediante el estudio inmunofenotípico, lo cual afianza la necesidad de realizar en todo momento un diagnóstico integrado.

› Bibliografía

1. Borowitz MJ, Chan JKC. B lymphoblastic leukaemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities. B Lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(v;11q23); MLL rearranged. En: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES,

Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (eds.). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008. pp. 171-5.

2. Carulli G, Marini A, Ferreri M, Azzarà A, Ottaviano V, Lari T, et al. B-cell acute lymphoblastic leukemia with t(4;11)(q21;q23) in a young woman: evolution into mixed phenotype acute leukemia with additional chromosomal aberrations in the course of therapy. Hematol Rep. 2012 Jul 11;4(3):e15.
3. Dunphy C, Gardner L, Evans L, Javadi N. CD15+ Acute Lymphoblastic Leukemia and Subsequent Monoblastic Leukemia. Arch Pathol Lab Med. 2001;125:1227-30.
4. Rayes A, McMasters R, O'Brien M. Lineage Switch in MLL-Rearranged Infant Leukemia Following CD19-Direct Therapy. Pediatr Blood Cancer. 2016;63:1113-5.
5. Aldoss I, Song JY. Extramedullary relapse of KMT2A (MLL)-rearranged acute lymphoblastic leukemia with lineage switch following blinatumomab. Blood. 2018;131:2507.
6. Jacoby E, Nguyen S, Fountaine1 T, Welp K, Gryder B, Qin H, et al. CD19 CAR immune pressure induces B-precursor acute lymphoblastic leukaemia lineage switch exposing inherent leukaemic plasticity. Nat Commun. 2016;7:12320.
7. Rossi J, Bernasconi A, Alonso C, Rubio P, Gallego M, Carrara C, et al. Lineage switch in childhood acute leukemia: An unusual event with poor outcome. Am J Hematol. 2012;87:890-7.
8. Jiang JG, Roman E, Nandula SV, Murty VV, Bhagat G, Alobeid B. Congenital MLL-positive B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) switched lineage relapse to acute myelocytic leukemia (AML) with persistent t(4;11) and t(1;6) traslocation and JH gene rearrangement. Leuk Lymphoma. 2005;46:1223-7.
9. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. Disponible en: http://AtlasGeneticsOncology.org.
10. Marchesi F, Girardi K, Avvisati G. Pathogenetic, Clinical, and Prognostic features of Adult t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4 Positive B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Adv Hematol. 2011;2011:621627.

Caso 3. Mujer de 39 años con lumbalgia, anemia y trombocitopenia

Concepción Prats-Martín[1], Rosario M. Morales-Camacho[1], Teresa Caballero-Velázquez[1], Estrella Carrillo[1], M. Teresa Vargas[1], Sergio Burillo[2], M. Isabel Montero[1], Ricardo Bernal[1], José Antonio Pérez-Simón[1], Juan José Borrero[3]

[1] Unidad de Gestión Clínica (UGC) de Hematología y Hemoterapia, [2] Servicio de Inmunología, UGC de Laboratorios Clínicos, [3] UGC de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla

› Motivo de consulta

Se trata de una paciente remitida de otro hospital por bicitopenia y sospecha de hemopatía aguda.

› Historia clínica

Mujer de 39 años con historia de alergia al ácido acetilsalicílico e intolerancia a los antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Presentaba desde hacía 4 meses lumbalgia izquierda intensa con hallazgo en una resonancia magnética nuclear (RMN) de una hernia lumbar L5-S1, que se trató con AINE. Un mes antes del ingreso fue intervenida por perforación de una úlcera yuxtapilórica, realizándose gastrectomía parcial. La persistencia del dolor lumbar refractario al tratamiento y el hallazgo de anemia y trombopenia motivaron su ingreso.

› Exploración física

A la auscultación cardiaca y respiratoria mostraba taquicardia y taquipnea. A la palpación se objetivaron 2 adenopatías laterocervicales, así como una esplenomegalia de 2 cm por debajo del reborde costal. El resto de la exploración física no mostraba hallazgos de interés.

› Pruebas analíticas

• **Hemograma**: leucocitos 15,9 × 10^9/L, neutrófilos 5,7 × 10^9/L, hemoglobina (Hb) 73 g/L, volumen corpuscular medio (VCM) 91,5 fL, plaquetas 48 × 10^9/L, reticulocitos 58,5 × 10^9/L.

• **Pruebas de coagulación:** dentro de la normalidad.

• **Bioquímica plasmática.** Destacan: GOT 68 U/L (10-37), GGT 521 UI/L (10-50), GPT 27 UI/L (10-40) y fosfatasa alcalina 539 UI/L (40-130). LDH: 1.970 UI/L (135-225); ferritina: 1.287 µg/L (15-150); transferrina: 145 mg/dL (200-330). Proteínas totales: 5,6 g/dL (6,5-8). Función renal y resto de la bioquímica normales. Velocidad de sedimentación globular (VSG): 97 mm/h (1-20). Proteinograma con IgG, IgA e IgM normales. Marcadores tumorales negativos. Estudio elemental de orina normal. Pruebas de autoinmunidad negativas.

• **Microbiología:** serologías negativas para virus de la hepatitis C (VHC) y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) –vacunada para virus de la hepatitis B (VHB)–; serología para virus de Epstein-Barr (VEB) IgM negativa e IgG positiva; citomegalovirus (CMV) IgM negativa e IgG positiva; virus de la varicela zóster (VVZ) IgG positiva. Urocultivo/Hemocultivos negativos.

› Pruebas de imagen

• **Tomografía axial computarizada** (TAC) toracoabdominal: adenopatías laterocervicales bajas y supraclaviculares izquierdas sin carácter significativo. Adenopatías axilares de pequeño tamaño (máximo: 1,2 cm). Hepatoesplenomegalia homogénea. Adenopatías múltiples retroperitoneales confluentes.

› Estudios citológicos y de citometría de flujo

En la extensión de **sangre periférica** se objetivaron leucocitos de 15,9 × 10^9/L, con la siguiente fórmula manual: 46% de células atípicas, mielocitos 4%, metamielocitos 6%, cayados 12%, segmentados 14%, linfocitos

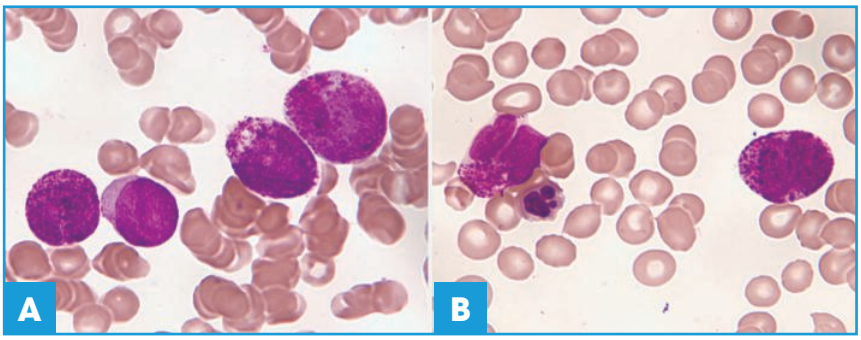


Figura 1. Sangre periférica (tinción de May-Grünwald-Giemsa –MGG–, × 1.000). A: grupo de células leucémicas, 3 de ellas hipergranulares; B: forma con el núcleo hendido en hachazo.

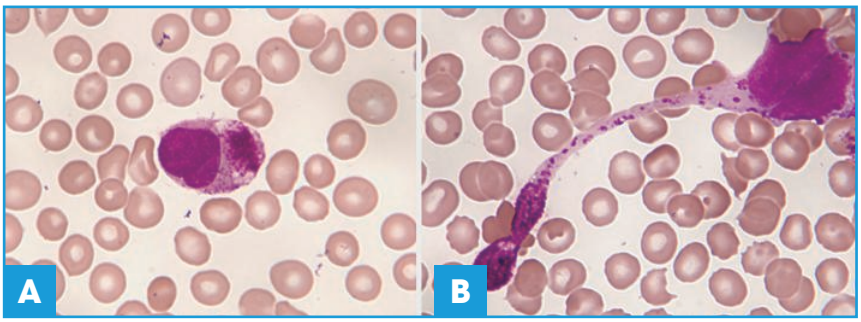


Figura 2. Sangre periférica (tinción de May-Grünwald-Giemsa –MGG–, × 1.000). A: célula con concentración de gránulos en un polo del citoplasma; B: célula con una proyección citoplasmática alargada.

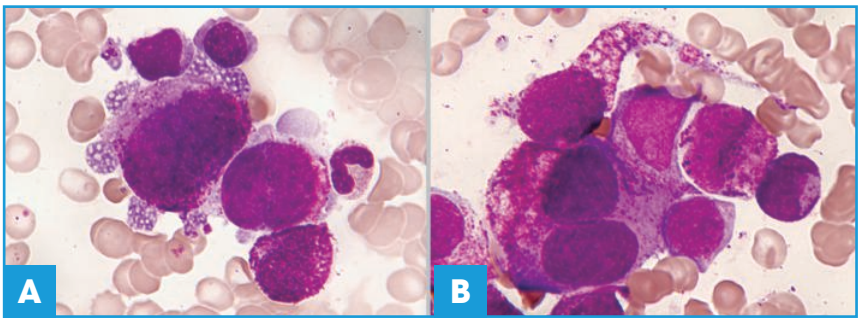


Figura 3. Aspirado de médula ósea (tinción de May-Grünwald-Giemsa –MGG–, × 1.000). A: blasto mastocítico grande con proyecciones mamelonadas con inclusiones vacuolares; B: en la parte superior de la fotografía, célula con una larga proyección citoplasmática.

17% y monocitos 1%. Eritroblastos: 21/100 leucocitos. La población patológica presentaba con frecuencia una morfología con citoplasma hipergranular (Figura 1A), algunas de ellas con la granulación concentrada en un polo (Figura 2A) y, de manera excepcional, tenían largos pseudópodos (Figura 2B). En ocasiones, el núcleo era bilobulado o en hachazo (Figura 1B).

El **aspirado medular** era hipercelular y polimórfico, con una serie eritroide del 6%, serie granulocítica del 3%, linfocitos del 2% y monocitos del 0,5%; la serie megacariocítica estaba bien representada. Se observó un 88,5% de células de aspecto atípico, de tamaño grande, con citoplasma amplio, algunos de contorno irregular con proyecciones mamelonadas y ocasionalmente vacuolados (Figura 3A); muy excepcionalmente (< 1%) se observaron formas con proyecciones largas a modo de pseudópodos semejantes a mastocitos leucémicos (Figura 3B). Además, tenían un patrón granular variable, desde formas agranulares a hipergranulares, a destacar en algunas de ellas la concentración de la granulación en un polo (Figura 4). Los núcleos eran redondeados con la cromatina ligeramente condensada, en general sin nucléolos y a menudo multilobulados/multinucleados y de gran tamaño (Figura 5). Se observaron imágenes de hemofagocitosis de hematíes, únicas o múltiples (Figura 6). Los macrófagos presentaban signos de activación con fenómenos de fagocitosis de hematíes, eritroblastos y plaquetas, y de manera excepcional de las células atípicas descritas (Figura 7).

Citoquímicamente, la población leucémica no mostraba actividad para mieloperoxidasa, cloroacetatoesterasa ni alfa-naftil-acetatoesterasa; la reacción del PAS presentaba intensa positividad granular que parecía coincidir con la vacuolización periférica. Con el azul de toluidina se observó una positividad del 100% con una franca metacromasia en la granulación, muy intensa en el área de concentración de los gránulos, aspecto característico del mastocito. El patrón de fosfatasa ácida fue positivo intenso, superponible al de los gránulos metacromáticos (Figura 8).

El estudio de **citometría de flujo** en médula ósea identificó una población de gran tamaño (FSC) y complejidad (SSC) que expresaba de manera muy intensa CD117, con un CD45 intermedio y negativa

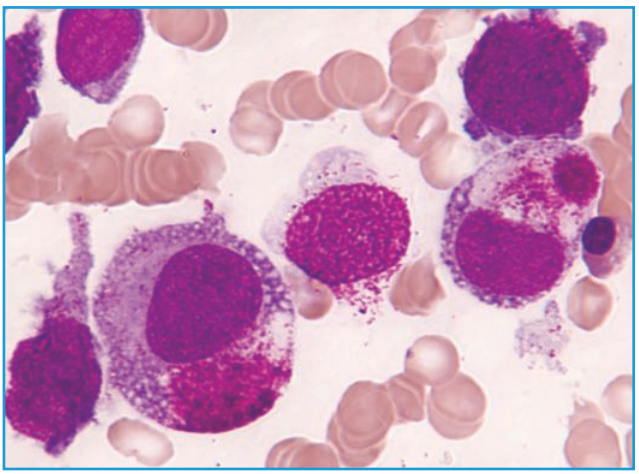


Figura 4. Aspirado de médula ósea (tinción de May-Grünwald-Giemsa –MGG–, × 1.000). Concentración de los gránulos en un extremo del citoplasma.

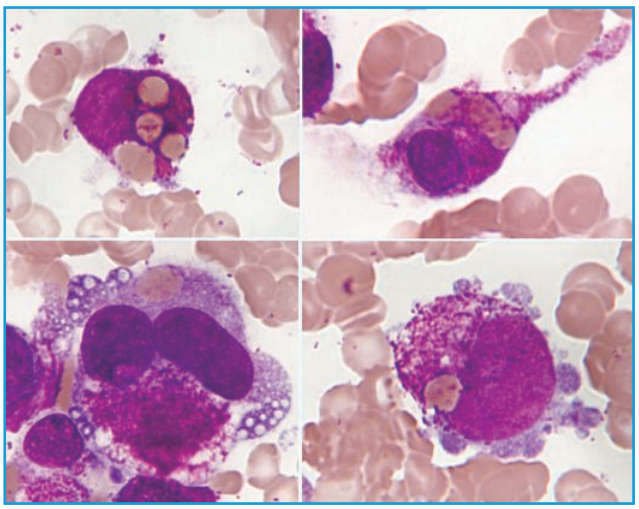


Figura 6. Aspirado de médula ósea (tinción de May-Grünwald-Giemsa –MGG–, × 1.000). Fagocitosis de eritrocitos.

para HLADR. Esta población no presentaba expresión del marcador de inmadurez CD34 y era negativa para mieloperoxidasa y marcadores de línea T (cCD3/sCD3) y B (CD19/cCD79a/CD10). En el resto del estudio inmunofenotípico destacaba la expresión intensa de CD203c, con negatividad para CD123, confirmando la línea del mastocito, con ausencia de expresión de CD25 y CD2, y expresión aberrante de CD30 (Figura 9).

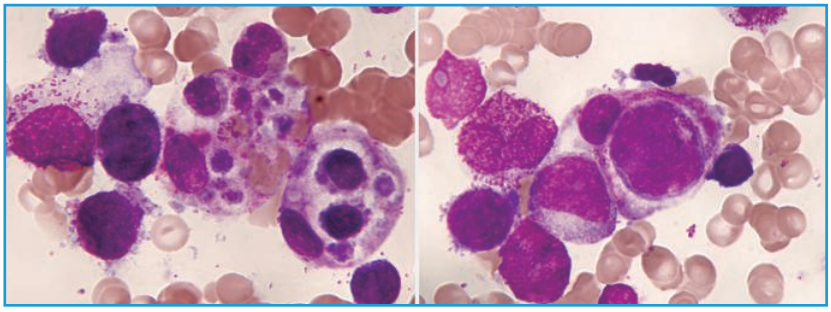


Figura 7. Aspirado de médula ósea (tinción de May-Grünwald-Giemsa –MGG–, × 1.000). A la izquierda, macrófagos con fagocitosis múltiple de eritroblastos y de plaquetas. A la derecha, un macrófago fagocitando una célula maligna.

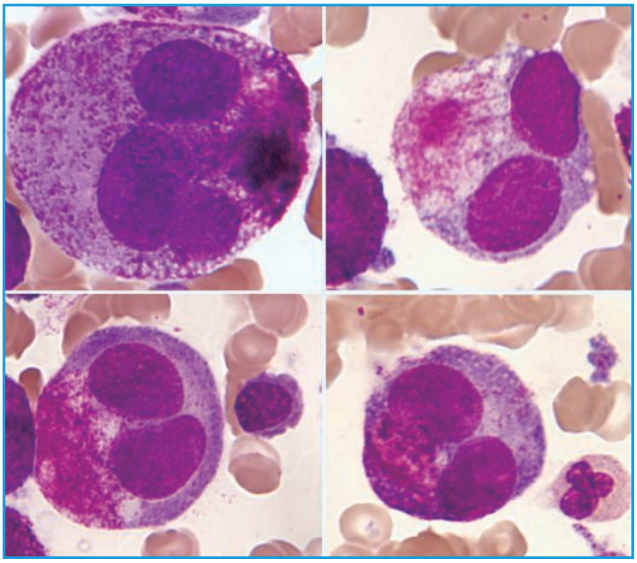


Figura 5. Aspirado de médula ósea (tinción de May-Grünwald-Giemsa –MGG–, × 1.000). Multilobularidad/Multinuclearidad.

› Estudio histológico de la biopsia de médula ósea

En la biopsia de médula ósea la hematoxilina eosina mostró una infiltración difusa por células medianas de citoplasma claro abundante, que en el estudio inmunohistoquímico eran cKit y triptasa positivas, y negativas para CD25. Se observó una fibrosis reticulínica de grado 2 (MF-2).

› Citogenética y estudio molecular

El estudio citogenético de la **médula ósea mostró un cariotipo complejo con alteraciones numéricas, variando el número de cromosomas entre 55 y 86, y múltiples** anomalías estructurales, que incluía la presencia de varios cromosomas marcadores, detectado en 12 de 20 metafases analizadas (Figura 10).

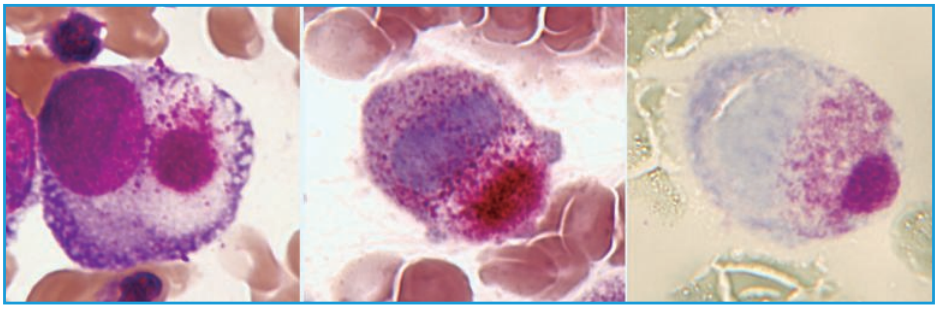


Figura 8. Aspirado de médula ósea. A la izquierda (tinción de May-Grünwald-Giemsa –MGG–, × 1.000), concentración de gránulos en la región centrosómica; en el centro, positividad intensa con fosfatasa ácida; a la derecha, metacromasia con azul de toluidina.

Se realizó hibridación *in situ* fluorescente (FISH), que descartó la presencia de deleción de 5q, monosomía 7/deleción de 7q31, deleción de p53, así como los reordenamientos *PML/RARA*, *BCR/ABL1* y *MLL*. Las mutaciones de *KIT* D816V y *FLT3-ITD* resultaron negativas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante PCR también se confirmó la ausencia del reordenamiento *PML/RARA*. Por último, se realizó un estudio de secuenciación masiva (NGS) para un panel amplio de genes implicados en neoplasia mieloide (Ion AmpliSeq™ AML CancerResearch Panel) incluidas las regiones *hotspot* del gen *KIT* (exones 8, 10, 11, 17) y 18 genes adicionales (regiones codificantes de *CEPBA*, *DNMT3A*, *GATA2*, *TET2*, *TP53* y regiones *hotspot* de *ASXL1*, *BRAF*, *CBL*, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *KIT*, *KRAS*, *NPM1*, *NRAS*, *PTPN11*, *RUNX1* y *WT1*), en el que no se identificaron mutaciones.

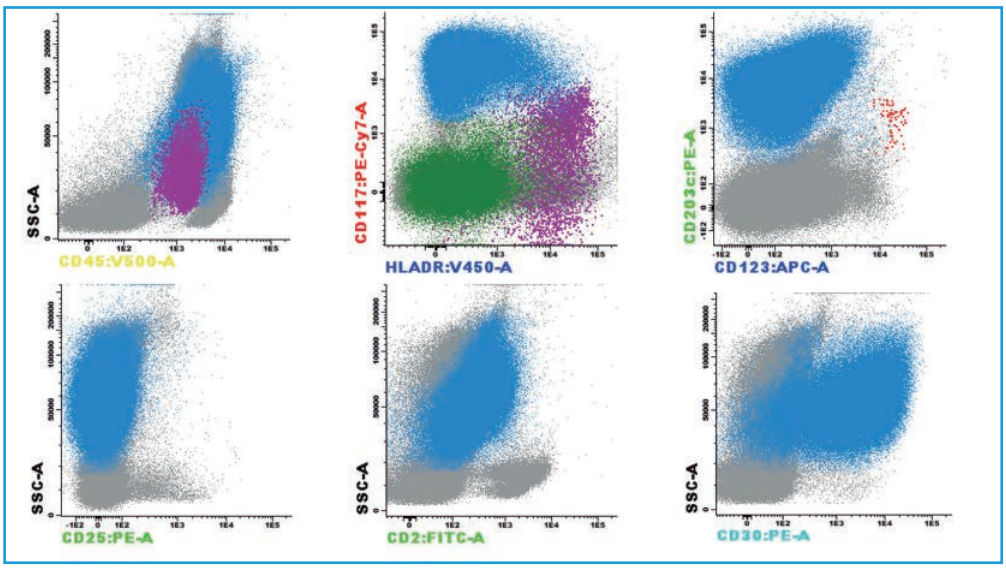


Figura 9. Citometría de flujo (médula ósea). La población de mastocitos se representa en color azul. En violeta progenitoras CD34. En verde neutrófilos. En rojo basófilos.

› Otras determinaciones

Con la orientación de los estudios citológico y citométrico se solicitó la determinación de triptasa sérica que resultó > 200 ng/mL (normal < 20 ng/mL).

› Diagnóstico

Leucemia de mastocitos (LCM), forma clásica, aguda y primaria.

› Evolución

La paciente recibió quimioterapia sistémica de inducción con citarabina (100 mg/m^2/día × 5 días) y fludarabina (50 mg intravenosos –i.v.–/día × 5 días), a la que se añadió imatinib (200 mg/día), además de tratamiento con corticoides y dexclorfeniramina. Tras el inicio del primer ciclo de tratamiento, presentó síntomas severos de liberación de mediadores, con disnea, broncoespasmo, *rash* urticarial, prurito y fiebre. Antes del segundo ciclo ingresó en situación de progresión de su leucemia a pesar del tratamiento, con hepatomegalia, ascitis, edemas en miembros inferiores, derrame pleural y pericárdico, y fiebre, que requirió de su ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos. Falleció a los 2 meses y 4 días del diagnóstico por un *shock* **séptico con fracaso multiorgánico y progresión de su enfermedad**.

› Discusión

La LCM es una forma de mastocitosis sistémica (MS) avanzada que se caracteriza por presentar un número igual o superior al 20% de mastocitos patológicos en el

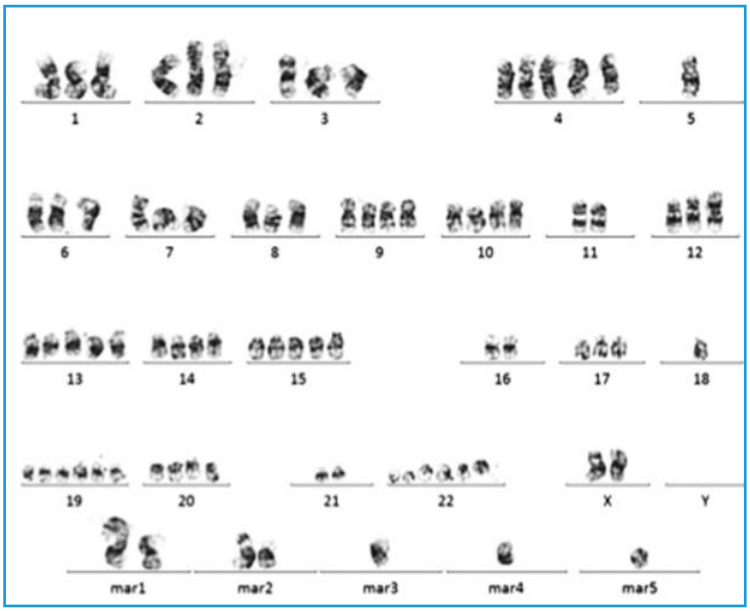


Figura 10. Cariotipo complejo (médula ósea): 55~86,XXX,+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5,inc[cp12]/46,XX[8].

aspirado de médula ósea[1,2]. Es una enfermedad rara (menos del 0,5% de las mastocitosis totales y < 1% de las MS)[3-5] y agresiva con una supervivencia muy pobre[5-8]. Se caracteriza por la infiltración mastocitaria en múltiples órganos: médula ósea, hígado, bazo, tracto digestivo, hueso, etc., y es infrecuente, a diferencia de las MS indolentes, la afectación cutánea[4,9]. Los síntomas derivan tanto de la infiltración orgánica como de la activación y liberación de mediadores (*flushing*, prurito, *rash* cutáneo, fiebre, malestar, diarrea, úlcera gastroduodenal, taquicardia, dolor óseo...). El diagnóstico requiere cumplir los criterios de MS, más la presencia de ≥ 20% de mastocitos en el aspirado medular[1,2], los cuales son morfológicamente atípicos (polimorfismo, hipogranularidad, concentración de la granulación en un polo, vacuolización, núcleos multilobulados/multinucleados y hemofagocitosis). Dentro de las LCM se reconocen la **forma clásica**, que es más infrecuente, con ≥ 10% de mastocitos en sangre, y la **variante** con < 10%; además, pueden ser **primarias**, cuando aparecen *de novo*, o **secundarias** por progresión de una mastocitosis previa. Por último, se diferencia una presentación **aguda**, en la que existe habitualmente daño orgánico (hallazgos C), de una **crónica** en la que los mastocitos a menudo son maduros y el curso clínico es menos agresivo[1,2]. La biopsia de médula ósea muestra una infiltración difusa por mastocitos atípicos e inmaduros. El estudio de citometría de flujo permite la identificación de la línea del mastocito, define su estadio madurativo y determina la presencia de marcadores aberrantes como CD25 (criterio diagnóstico menor), CD2 u otros como CD30 que pueden tener utilidad como diana terapéutica[10]. Respecto al cariotipo, no se describen anomalías citogenéticas recurrentes, siendo lo más común el hallazgo de un cariotipo normal (entre el 79 y el 92%). La mutación de *KIT* se detecta hasta en un 89% de los casos, la más habitual D816V (37,5 a 68%), y es frecuente la presencia de mutaciones adicionales (68-100%), que van a tener relevancia pronóstica (*SRSF2/ASXL1/RUNX1*) hasta en el 52% de los casos[5-7] (Tabla 1). En el tratamiento se emplean regímenes de quimioterapia, inhibidores de tirosina cinasa y trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos; el pronóstico es malo, con una supervivencia pobre[1,5-7,11-14].

El caso descrito cumple criterios de MS, por tener el criterio mayor y 2 menores (elevación de triptasa

Tabla 1. Hallazgos citogenéticos y moleculares en 4 series publicadas de leucemia de células mastocíticas

Series	Pacientes	Enfermedad asociada	Mutación KIT	Mutaciones adicionales	Cariotipo	Supervivencia (mediana)
Georgin-Lavialle *et al.* (Blood. 2013)	51	8% (4/51)	19/28 (67%) D816V 13/28 (46%)	ND	Normal 19/23 (83%) 0 complejos	6 meses
Jawhar *et al.* (Haematologica. 2017)	28	71% (20/28)	25/28 (89%) D816V 19/28 (68%)	17/25 (68%) REL 13/25 (52%)*	Normal 19/24 (79%) 3 complejos (12,5%)	17 meses
Jain *et al.* (Leuk Res. 2017)	13	31% (4/13)	5/8 (62,5%) D816V 3/8 (37,5%)	8/8 (100%) REL 3/8 (37,5%)*	Normal 11/12 (92%) 1 complejo (8%)	31 meses
Justin Budnik *et al.* (Leuk Res. 2019)	75	ND	ND	ND	ND	9,4 meses

* Mutaciones relevantes *(SRSF2/ASXL1/RUNX1)*

y morfología atípica). La elevada infiltración por mastocitos en el aspirado medular (> 20%) lo cataloga como LCM. Se trata además de una forma clásica con un elevado porcentaje de mastocitos en sangre y aguda por la presencia de hallazgos C (insuficiencia medular con citopenias por la infiltración medular y hepatoesplenomegalia). Al carecer de diagnóstico previo de mastocitosis, correspondería a una forma primaria o *de novo*. Entre las atipias observadas en los mastocitos leucémicos destaca su polimorfismo, la variabilidad de su contenido granular, la frecuencia de la concentración de gránulos en un polo de la célula (constatada con el azul de toluidina y la actividad de fosfatasa ácida) la multilobularidad/multinuclearidad y la observación de eritrofagocitosis.

Con respecto al diagnóstico diferencial, la observación inicial de células hipergranulares en sangre plantea la duda con blastos promielocíticos, si bien se descarta este diagnóstico por las características atipias de los mastocitos medulares, la citometría, la ausencia de mieloperoxidasa y de reordenamiento *PML/RARA*. Otros tipos de leucemia aguda mieloblástica, incluida la leucemia aguda de basófilos, con la que debe establecerse el diagnóstico diferencial, se excluyen por la elevada triptasa y el perfil citométrico. No hay datos citomorfológicos, fenotípicos o moleculares de la presencia de otra hemopatía acompañante, lo que descarta una LCM con una neoplasia hematológica asociada, y se diferencia de una MS agresiva por la presencia de ≥ 20% de mastocitos en la médula ósea. Por último, al cumplir criterios de MS, queda excluida una leucemia mielomastocítica[15].

La supervivencia en este caso fue muy corta y destacó en su estudio la ausencia de mutaciones en *KIT*, la ausencia de mutaciones adicionales de mal pronóstico y el hallazgo de un cariotipo complejo. El impacto pronóstico del perfil mutacional en las MS avanzadas está bien establecido, especialmente la presencia de mutaciones en *SRSF2*, *ASXL1* y *RUNX1*[16-18], y en una serie de LCM también se demuestra su valor pronóstico adverso[6]. Sin embargo, la información disponible en cuanto al posible papel pronóstico del cariotipo es escasa. En una serie reciente de 109 MS se aporta valor pronóstico independiente al hallazgo de un cariotipo de riesgo en MS avanzadas, aunque esta serie incluye 18 LCM y solo 4 presentaban anomalías en el cariotipo, siendo todos casos con otra neoplasia hematológica asociada, a diferencia de este caso[19]. En otro estudio posterior, sin embargo, no se comprueba el papel pronóstico independiente del cariotipo[20].

› Conclusiones a recordar

- La morfología de los mastocitos leucémicos hipergranulares en sangre plantea el diagnóstico diferencial con la leucemia promielocítica aguda, que es descartada fundamentalmente por la ausencia de actividad de mieloperoxidasa y del reordenamiento *PML-RARA*.
- Son características típicas de los mastocitos neoplásicos su polimorfismo, granularidad variable, la concentración de gránulos en un polo de la célula, metacromasia con azul de toluidina, largos pseudópodos, multilobulación/multinuclearidad, presencia de vacuolas y hemofagocitosis. Además, el estudio por citometría de flujo de estos mastocitos atípicos suele mostrar patrones de expresión anómalos.
- En este caso, se valoró la posible asociación de un cariotipo complejo, como posible factor de mal pronóstico ligado a una supervivencia muy corta, dado que no presentaba alteraciones moleculares.

› Bibliografía

1. Valent P, Akin C, Metcalfe DD. Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts. Blood. 2017;129(11):1420-7.
2. Horny HP, Akin C, Arber DA, Peterson LC, Tefferi A, Metcalfe DD, 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. Lyon: IARC; 2017. pp. 61-9.
3. Cohen SS, Skovbo S, Vestergaard H, Kristensen T, Møller M, Bindslev-Jensen C, et al. Epidemiology of systemic mastocytosis in Denmark. Br J Haematol. 2014;166(4):521-8.
4. Lim KH, Tefferi A, Lasho TL, Finke C, Patnaik M, Butterfield JH, et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. Blood. 2009;113(23):5727-36.
5. Georgin-Lavialle S, Lhermitte L, Dubreuil P, Chandesris MO, Hermine O, Damaj G. Mast cell leukemia. Blood. 2013;121(8):1285-95.
6. Jawhar M, Schwaab J, Meggendorfer M, Naumann N, Horny HP, Sotlar K, et al. The clinical and molecular diversity of mast cell leukemia with or without associated hematologic neoplasm. Haematologica. 2017 Jun;102(6):1035-43.
7. Jain P, Wang S, Patel KP, Sarwari N, Cortes J, Kantarjian H, et al. Mast cell leukemia (MCL): Clinico-pathologic and molecular features and survival outcome. Leuk Res. 2017;59:105-9.

8. Budnik J, Milano MT. A registry-based analysis of survival outcomes in mast cell leukemia. Leuk Res. 2019 Jan 16;78:24-8.
9. Valent P, Horny HP, Escribano L, Longley BJ, Li CY, Schwartz LB, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. Leuk Res. 2001 Jul;25(7):603-25.
10. Sánchez-Muñoz L, Teodosio C, Morgado JM, Perbellini O, Mayado A, Álvarez-Twose I, et al. Flow cytometry in mastocytosis: utility as a diagnostic and prognostic tool. Immunol Allergy Clin North Am. 2014;34(2):297-313.
11. Gotlib J, Kluin-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.
12. 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.
13. Ustun C, Gotlib J, Popat U, Artz A, Litzow M, Reiter A, et al. Consensus Opinion on Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Advanced Systemic Mastocytosis. Biol Blood Marrow Transplant. 2016;22(8):1348-56.
14. Ustun C, Arock M, Kluin-Nelemans HC, Reiter A, Sperr WR, George T, et al. Advanced systemic mastocytosis: from molecular and genetic progress to clinical practice. Haematologica. 2016;101:1133-43.
15. 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.
16. Pardanani A, Lasho T, Elala Y, Wassie E, Finke C, Reichard KK, et al. Next-generation sequencing in systemic mastocytosis: derivation of a mutation-augmented clinical prognostic model for survival. Am J Hematol. 2016;91:888-93.
17. 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; 30:136-43.
18. Jawhar M, Schwaab J, Hausmann D, Clemens J, Naumann N, Henzler T, et al. Splenomegaly, elevated alkaline phosphatase and mutations in the SRSF2/ASXL1/RUNX1 gene panel are strong adverse prognostic markers in patients with systemic mastocytosis. Leukemia. 2016;30:2342-50.
19. Naumann N, Jawhar M, Schwaab J, Kluger S, Lübke J, Metzgeroth G, et al. Incidence and prognostic impact of cytogenetic aberrations in patients with systemic mastocytosis. Genes Chromosomes Cancer. 2018 May;57(5):252-9.
20. Shah S, Pardanani A, Elala YC, Lasho TL, Patnaik MM, Reichard KK, et al. Cytogenetic abnormalities in systemic mastocytosis: WHO subcategory-specific incidence and prognostic impact among 348 informative cases. Am J Hematol. 2018 Dec;93(12):1461-6.

Caso 4. Paciente varón de 74 años con linfocitosis. El valor de la citología en un caso atípico

Carlos de Miguel Sánchez[1], Diego Robles[1], Laida Cuevas[1], Ariane Unamunzaga[1], Ana Vega[1], Ana Santamaría[1], Ernesto Pérez Persona[1], Itziar Oiartzábal[1], Miren Gabilondo[1], Carlos Pisón[1], Gala Aglaia Méndez[1], Francisco Rodríguez[1], Ángel Pereda[1], Carmen Menchaca[1], Ingrid Parra[1], María Julia de Diego[2], María José Larráyoz[3], María José Calasanz[3], Arantza Mendizábal[1], José María Guinea de Castro[1]

[1] Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario de Álava, Txagorritxu, Vitoria; [2] Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario de Álava, Txagorritxu, Vitoria; [3] CIMA Lab Diagnostics, Universidad de Navarra, Pamplona

› Motivo de consulta

Se trata de un paciente asintomático. Se detectó leucocitosis a expensas de linfocitosis en un hemograma de rutina.

› Historia clínica

Es un paciente varón de 74 años, exfumador de 4 paquetes/año y enolismo grave, con antecedentes médicos de hipertensión arterial, hipertrofia benigna de próstata y adenocarcinoma de estómago, diagnosticado a los 58 años, que se trató mediante gastrectomía total y tratamiento quimioterápico complementario.

› Exploración física

Buen estado general, normohidratado y normoperfundido. Se palpaban adenopatías laterocervicales bilaterales de pequeño tamaño (diámetro máximo 2 centímetros). El resto de la exploración no mostró hallazgos de interés.

› Pruebas complementarias

• **Hemograma.** Hemoglobina: 128 g/L; volumen corpuscular medio: 89 fL; plaquetas: 130 × 10^9/L; leucocitos: 44,4 × 10^9/L (neutrófilos: 6%; linfocitos: 91,4%; monocitos: 1,6%; eosinófilos: 0,7%; basófilos: 0,3%).

• **Bioquímica:** LDH sérica 496 U/L (125-250). Parámetros de función renal, pruebas de función hepática e ionograma dentro de los valores de normalidad.

• **Estudio morfológico de sangre periférica:** se observó un 93% de células linfoides, correspondiendo en su práctica totalidad a una población de linfocitos de pequeño-mediano tamaño con alta relación núcleo/citoplasma, núcleo habitualmente redondeado u oval de contorno regular y cromatina de aspecto condensado con frecuente presencia de nucléolo, habitualmente único y prominente, citoplasma escaso, intensamente basófilo y agranular, con frecuente formación de pequeños mamelones citoplasmáticos (Figuras 1 y 2).

• **Estudio de poblaciones linfocitarias:** con los hallazgos previos, se realizó en primer lugar un *screening* de poblaciones linfocitarias en sangre periférica según protocolo automatizado, con dispensación de muestra y anticuerpos mediante BD FACS™ Sample Prep Assistant III, empleando posteriormente un citómetro BD FACS™ Canto II con programa de análisis BD FACS™ Canto Software. En el estudio destacaba tan solo un leve aumento de las células NK –CD16+/CD56+ (22,79%), CD3+ (61,37%) y CD19+ (8,21%)– (Figura 3).

En vista de la discordancia de los hallazgos morfológicos con los resultados del análisis de poblaciones linfocitarias, se corroboró que, efectivamente, la muestra correspondía al paciente indicado y se repitió el estudio citométrico de subpoblaciones mediante el mismo procedimiento, siendo los datos obtenidos superponibles. Ante la persistencia de las divergencias, se solicitó un estudio inmunofenotípico ampliado en sangre periférica.

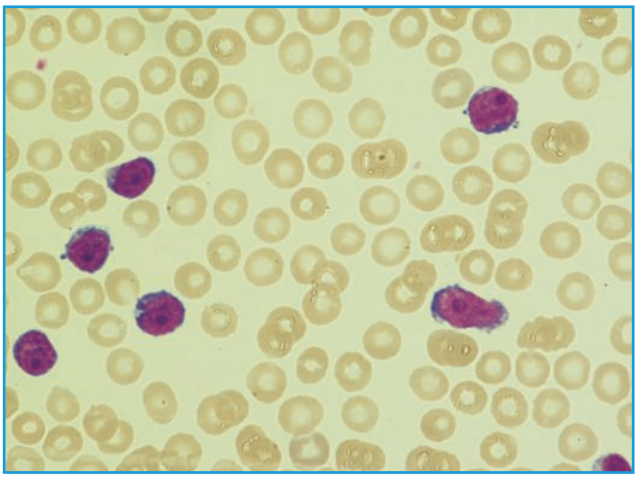


Figura 1. Extensión de sangre periférica (May-Grünwald-Giemsa, × 100): células linfoides de pequeño-mediano tamaño, núcleo redondeado u oval con cromatina de aspecto condensado y nucléolo prominente, y citoplasma escaso, agranular e intensamente basófilo.

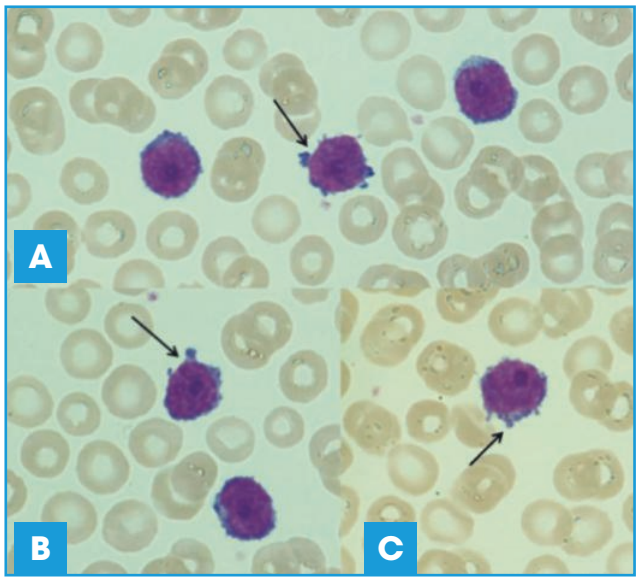


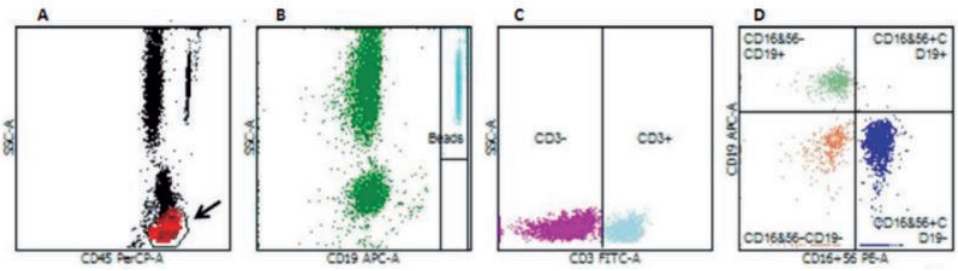
Figura 2. A, B, C: extensión de sangre periférica (May-Grünwald-Giemsa, × 100). Presencia de pequeños mamelones o *blebs* citoplasmáticos en las células linfoides (flechas negras).

• **Citometría de flujo de sangre periférica.** Destacaba fundamentalmente la presencia de 2 poblaciones patológicas (Figura 4):

– En la región de linfocitos se detectó un **0,55%** de eventos respecto a la celularidad total que correspondió a una población linfoide T aberrante con ausencia de **CD3**, CD8, CD19, CD56, TCR gamma-delta y expresión de **CD4** y **CD5**.

– En la región CD45 negativa destacó la presencia de un **78,5%** de eventos (respecto a la celularidad total) que correspondieron a una población linfoide T aberrante con escaso tamaño (FSC) y complejidad (SSC) que presentaba: ausencia de expresión de **CD45**, CD8, CD19, CD33, CD34, CD56, HLADR, **nuTdT**, TCR gamma-delta y expresión de CD2, **CD3, CD4, CD5, CD7 y CD38.**

• **Aspirado de médula ósea.** Marcado incremento de la celularidad, evidenciándose un 69% de infiltración por una población linfoide monomorfa de pequeño-mediano tamaño que desplazaba el resto de las líneas celulares y presentaba las siguientes características citológicas: núcleo redondeado, cromatina condensada con visualización de nucléolo (aunque menos frecuente



Parámetro	Porcentaje (%)	Valor absoluto/µL
Eventos linfoides CD45+		4.590
Esferas		976
CD3+	61,37	2.817
CD16+CD56+	22,79	1.046
CD19+	8,21	376

Figura 3. Análisis de poblaciones linfocitarias mediante BD FACS™ Canto II y BD FACS™ Canto Software. A: se muestra el área de análisis en la región linfoide de acuerdo con SSC/CD45 (flecha negra); B: se observan las esferas (*beads*) que permiten la cuantificación absoluta de linfocitos; C: separación de linfocitos T (CD3+) (azul celeste) *versus* linfocitos no T (CD3–) (rosa); D: separación de linfocitos no T (CD3–) en linfocitos B (CD16–/CD56–/CD19+) (verde claro) y células NK (CD16+/CD56+/CD19–) (azul oscuro).

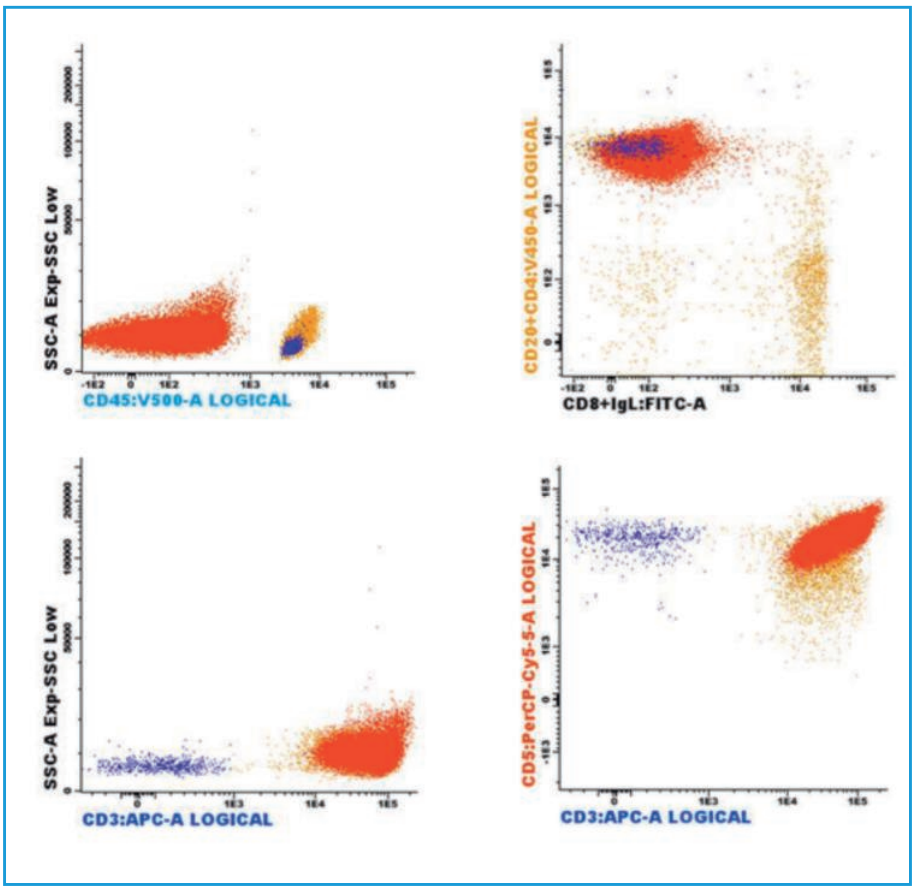


Figura 4. Citometría de flujo de sangre periférica. Coexistencia de una población linfoide T aberrante mayoritaria CD3+/CD4+/CD45– (naranja) y una segunda población linfoide T aberrante minoritaria CD3–/CD4+/CD45+ (azul). Población linfoide T residual normal (amarillo). Nota: no se muestra la población granulocítica y monocítica remanente.

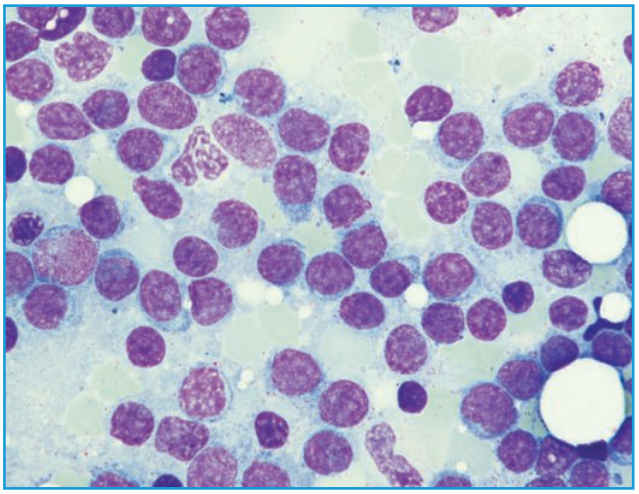


Figura 5. Aspirado de médula ósea (May-Grünwald-Giemsa, × 100): infiltración por células linfoides de mediano tamaño, cromatina condensada con eventual nucléolo y basofilia citoplasmática.

y evidente que en la sangre periférica), citoplasma escaso a moderado con marcada basofilia y eventual visualización de mamelones citoplasmáticos (Figura 5). La práctica totalidad de las células linfoides mostraban positividad con un patrón centrosómico para la tinción de la fosfatasa ácida (Figura 6).

• **Biopsia de médula ósea:** incremento de la celularidad global a expensas de una celularidad de pequeño tamaño con núcleo hipercromático que resultó positiva mediante inmunohistoquímica para CD3, CD4, CD5 y CD7. Escasa representación de celularidad hematopoyética con elementos de la serie roja, megacariocitos y serie mieloide sin paro madurativo. No se identificó un aumento de la red de reticulina mediante la tinción argéntica de reticulina de Wilder. El estudio para CD34 resultó negativo (Figuras 7 y 8).

• **Estudio citogenético en médula ósea.** Se evidenció la presencia del siguiente cariotipo complejo: 43,X,–Y,–8,i(8)(q10),–10,–14,der(15;21)(q10;q10),–17,–18,–21,–22,+6mar [29/30 o 97%]/46,XY[1/30 o 3%] (Figura 9).

• **Biología molecular (reordenamiento del gen del receptor de linfocitos T –TCR– en médula ósea:** el estudio del reordenamiento de TCR gamma en médula ósea fue positivo biclonal (región VJ-A), sugiriendo la presencia de 2 poblaciones clonales T (Figura 10).

• **Tomografía axial computarizada (TAC) toracoabdominopélvica:** esplenomegalia (14 centímetros). Múltiples adenopatías en las regiones cervicales posteriores, axilares, supraclavicular derecha, mediastínicas, mesentéricas y en pelvis menor, siendo sospechosas, por su tamaño incrementado, las evidenciadas en las áreas axilares (eje corto máximo 13 milímetros), hilio pulmonar derecho, área mesorrenal derecha y áreas inguinales (eje corto máximo 14 milímetros en el lado derecho).

› Diagnóstico

Leucemia prolinfocítica T (LPL-T).

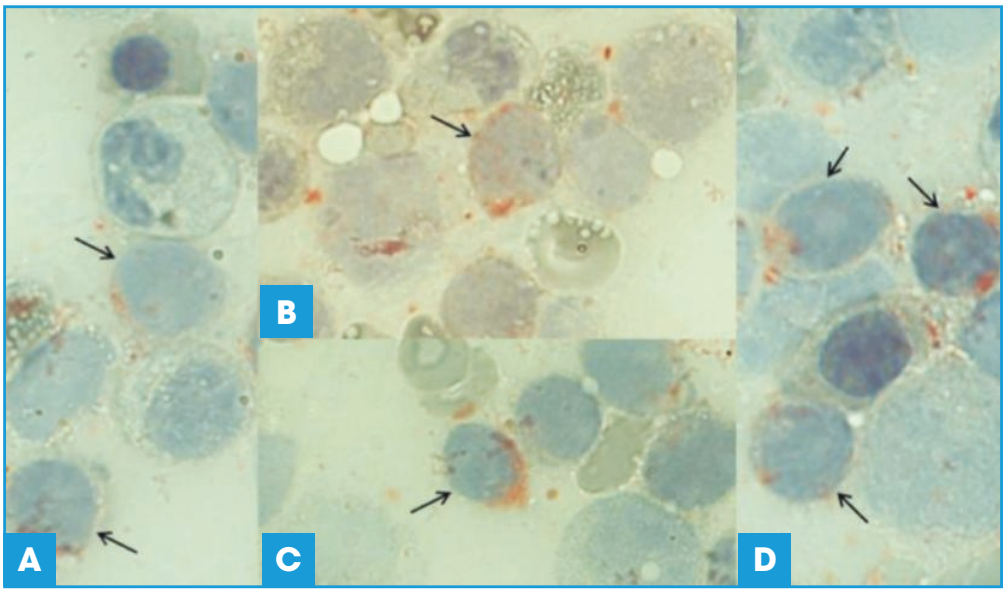


Figura 6. A, B, C, D: aspirado de médula ósea (tinción de fosfatasa ácida). Positividad con patrón centrosómico para fosfatasa ácida en células linfoides (flechas negras).

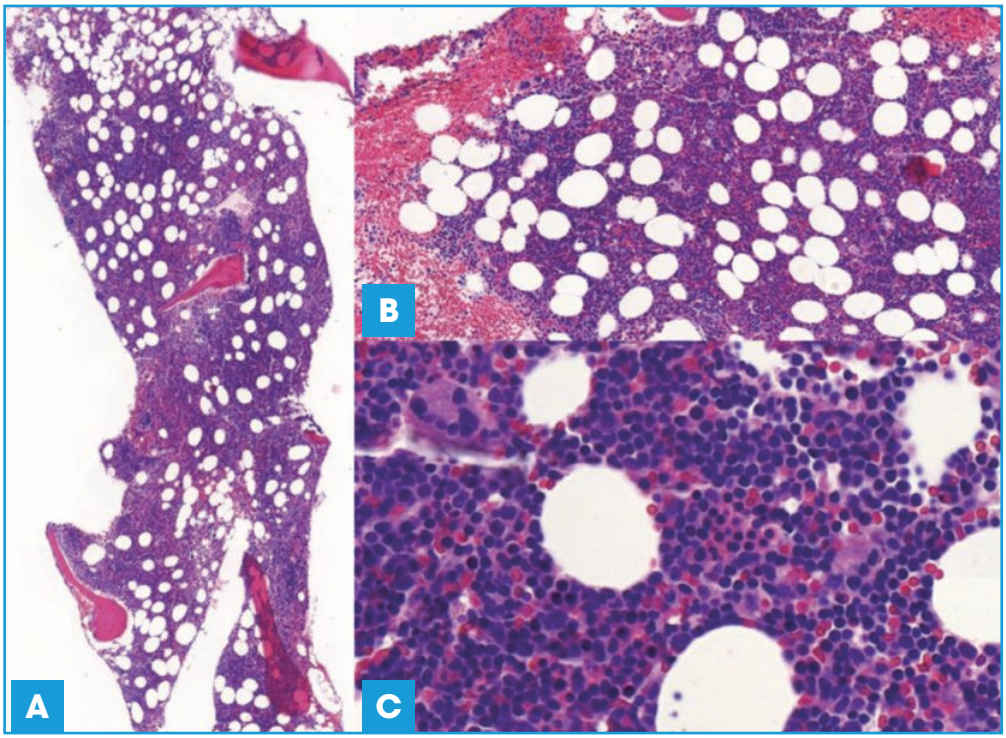


Figura 7. Biopsia de médula ósea. A: hematoxilina-eosina (5,9 ×); B: hematoxilina-eosina (12,0 ×); C: hematoxilina-eosina (40,0 ×). Incremento de la celularidad medular global a expensas de infiltración por una celularidad de pequeño tamaño con núcleo hipercromático.

› Tratamiento y evolución

El paciente recibió tratamiento con alemtuzumab intravenoso, con escalada de dosis bien tolerada, durante un periodo de 8 semanas, en el que recibió un total de 24 dosis de 30 mg, 3 días/semana. No presentó episodios infecciosos destacables. Tras finalizar el tratamiento se encontraba asintomático, con ausencia de visceromegalias y con normalización de los recuentos linfocitarios, alcanzando la remisión completa (RC) con estudio morfológico y citométrico en sangre periférica negativo y en médula ósea con enfermedad mínima residual negativa, cariotipo normal y reordenamiento TCR gamma policlonal. Se consideró en RC, se suspendió el alemtuzumab y se decidió adoptar una conducta expectante, al no ser candidato para trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) de consolidación. En el sexto mes postratamiento, el paciente se mantiene en RC.

› Discusión

La LPL-T es una neoplasia de célula T postímica madura[1]. La LPL-T resulta de la proliferación clonal de un linfocito T inmunológicamente maduro que, por lo ge-

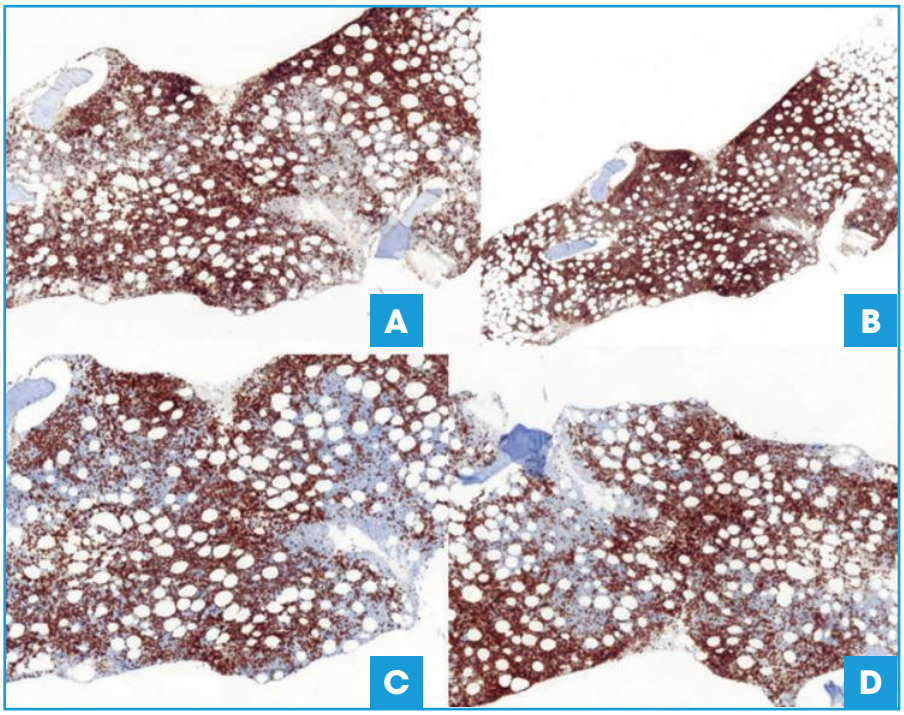


Figura 8. Biopsia de médula ósea. Inmunohistoquímica. A: CD3 (5,0 ×); B: CD4 (3,3 ×); C: CD5 (6,8 ×); D: CD7 (5,7 ×). Se observa positividad intensa mediante inmunohistoquímica para los marcadores CD3, CD4, CD5 y CD7.

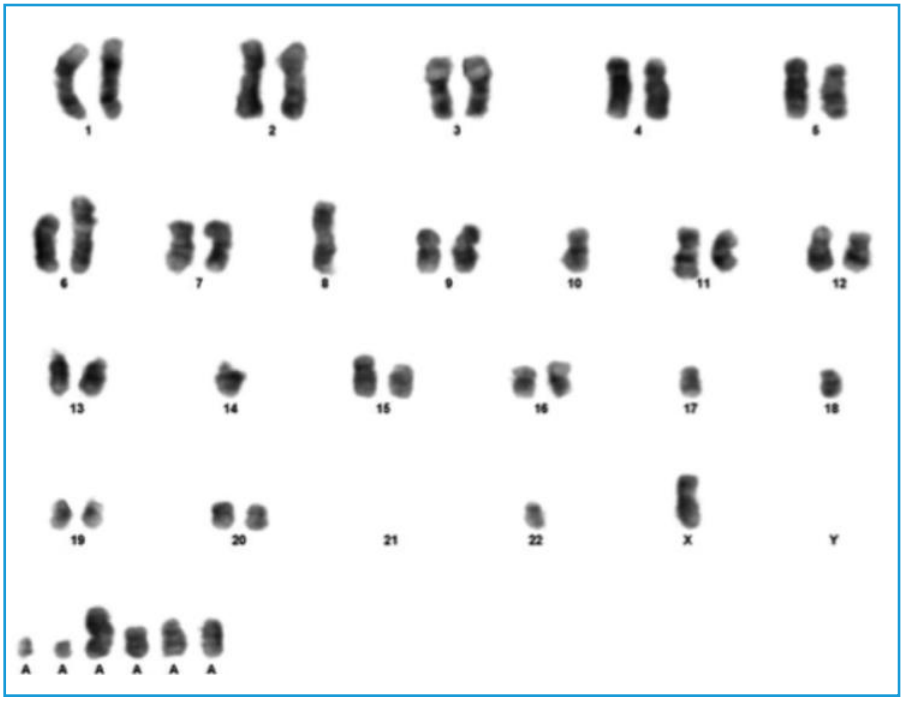


Figura 9. Cariotipo en médula ósea. Fórmula cromosómica: 43,X,–Y,–8,i(8)(q10),-10,–14,der(15;21)(q10;q10),–17,–18,–21,–22,+6mar[29/30 o 97%].

neral, muestra una morfología característica y se denomina prolinfocito. En la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2017 se engloba dentro de las "Neoplasias maduras de células T y NK". Se trata de una enfermedad rara e infrecuente, que supone el 2% de las leucemias linfoides de células maduras en adultos[2,3]. La edad mediana de presentación es 61 años, con predominio en varones (2:1)[1,3]. Se trata de una enfermedad de curso agresivo, con tan solo un 15% de los pacientes asintomáticos al diagnóstico[1]. La mayor parte de los pacientes presenta una breve historia de síntomas B asociados, hepatoesplenomegalia y marcada linfocitosis (típicamente > 100 × 10^9/L). La esplenomegalia (a veces masiva) es el hallazgo más común en la exploración física[1]. La presencia de adenopatías es común en la mayoría de los casos, aunque raramente alcanzan un tamaño voluminoso[4], evidenciándose *rash* maculopapular o nodular, así como derrame pleuroperitoneal hasta en una cuarta parte de pacientes con LPL-T[5]. El paciente presentado supone un caso atípico en cuanto a su presentación clínica, al evidenciarse un recuento linfocitario inferior al habitualmente descrito y ausencia de sintomatología asociada.

El hecho de que la LPL-T se trate de una enfermedad de presentación excepcional implica un difícil reconocimiento de la misma y supone un auténtico reto diagnóstico. La confirmación diagnóstica requiere una aproximación sistemática integrada del estudio morfológico en combinación con otras herramientas

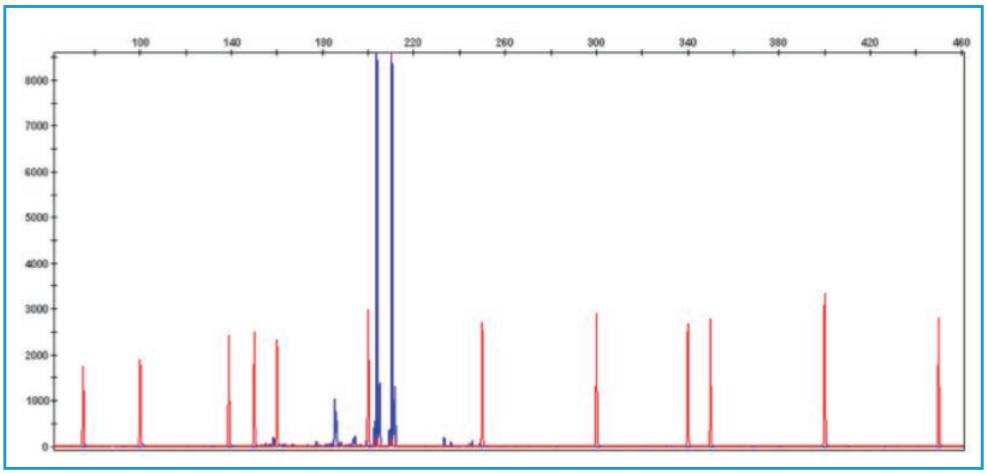


Figura 10. PCR de reordenamiento *TCR gamma* mostrando la presencia de un doble pico (azul) de similar tamaño, sugiriendo la presencia de una doble población clonal T.

de laboratorio, tales como el estudio inmunofenotípico, citogenético y de biología molecular. En nuestro caso, fue dicha aproximación integrada la que permitió un diagnóstico final correcto.

La evaluación del frotis de sangre periférica es una herramienta clave y aporta en muchas ocasiones la primera sospecha diagnóstica[6]. La LPL-T presenta 3 variantes morfológicas fundamentales: clásica, célula pequeña y célula cerebriforme (Sézary *cell-like*). Los prolinfocitos en su variante clásica (75% de casos de LPL-T) corresponden a células de mediano tamaño, alta relación núcleo-citoplasma, núcleo redondeado o irregular, cromatina densa-parcialmente condensada y presencia de un nucléolo prominente con citoplasma escaso y basófilo que presenta frecuentes protrusiones o *blebs*[4,5]. Los prolinfocitos de la LPL-T y de su contrapartida de linaje B (leucemia prolinfocítica B –LPL-B–) pueden llegar a ser indistinguibles morfológicamente; sin embargo, la LPL-T presenta ciertas características citológicas particulares que ayudan en su distinción: los prolinfocitos son frecuentemente de menor tamaño, el núcleo es hipercromático con mayor frecuencia, mayor grado de basofilia citoplasmática y suelen presentar los ya mencionados y característicos mamelones o *blebs* citoplasmáticos[7,8]. Nuestro caso presentaba la morfología característica de una LPL-T en su variante clásica, siendo evidente la presencia de las típicas protrusiones citoplasmáticas. En relación con el resto de variantes morfológicas, la variante de célula pequeña (20-25% de los casos) presenta prolinfocitos de pequeño tamaño con un nucléolo solo visible por microscopía electrónica[6], mientras que la variante cerebriforme (5% de los casos) destaca por el aspecto convoluto del núcleo[4,7]. Ambas variantes tienen características clínicas, inmunofenotípicas y citogenéticas similares a la LPL-T clásica[1].

La morfología en otros tejidos como la médula ósea puede llegar a ser menos informativa y no permitir una clara distinción con otras neoplasias de células T periféricas[1]. La infiltración de la médula ósea es frecuente, habitualmente con un patrón mixto (difuso e intersticial) y con fibrosis reticulínica asociada. El presente caso mostraba infiltración en médula ósea, con la particularidad morfológica de un nucléolo menos evidente y prominente que en sangre periférica, y con ausencia de fibrosis reticulínica en la biopsia de médula ósea, a diferencia de lo descrito en la literatura.

La citometría de flujo en la LPL-T confirma la naturaleza de célula T postímica madura, mostrando un fenotipo con expresión de CD2, CD3, CD5 y CD7, ausencia de CD34, nuTdT y CD1a, junto con expresión generalmente fuerte de CD45 y expresión variable de CD4 y CD8[2,4,9]. La expresión de CD3 citoplasmático es siempre constante, mientras que la de CD3 de superficie puede ser débil o incluso negativa, siendo positiva en más de dos tercios de los casos, aproximadamente[1-4]. Asimismo, destaca la expresión fuerte de CD7, que la diferencia de otras neoplasias T maduras, así como de CD52, que supone una diana terapéutica fundamental en esta enfermedad[1,10]. El 60% de los casos son CD4+/CD8–, como en el caso aquí descrito, mientras que el 25% coexpresa CD4+/CD8+[1,4].

La particularidad esencial del caso presentado reside precisamente en su perfil inmunofenotípico, al mostrar una ausencia total de expresión de CD45, lo que supone una situación excepcional, objetivándose tan solo en un 5% aproximadamente de los casos de LPL-T de acuerdo con la literatura[9,11]. Este hecho supuso una discordancia entre el análisis de las poblaciones linfocitarias mediante BD FACS™ Canto II y los hallazgos morfológicos de sangre periférica, debido a que la región CD45– no forma parte de la estrategia de

análisis automatizado, pese a lo cual, y en función de la alta sospecha citológica, se procedió a realizar un análisis citométrico, que inicialmente resultó igualmente infructuoso debido a importantes discordancias cuantitativas con los hallazgos morfológicos, ya que la estrategia de análisis citométrico de leucemias/linfomas de células T maduras se basa, en una primera aproximación, en la evaluación del área de linfocitos definida mediante SSC/CD45, lo que, en los casos excepcionales de LPL-T con ausencia de CD45, puede derivar en errores analíticos que generen falsos negativos al ignorar la población problema[11]. La situación se resolvió con el análisis alternativo del área CD45-, que demostró finalmente la presencia del grueso de la población T aberrante. Por otro lado, destaca la presencia de una segunda población T aberrante muy minoritaria, CD45+/CD4+ con pérdida de CD3 superficie, lo que supone otra circunstancia atípica adicional desde el punto de vista citométrico.

La LPL-T se caracteriza frecuentemente por la presencia de un cariotipo complejo con anomalías estructurales y numéricas que implican a múltiples cromosomas[12]. Las anomalías recurrentes más comunes afectan a los cromosomas 14, 8, 11 y X[13], siendo las más frecuentes las que afectan al cromosoma 14 (80-90% de los casos) y siendo la inversión del cromosoma 14 –inv(14)(q11;q32)– la más frecuente y característica[2,4,14]. Las anomalías del cromosoma 8 –t(8;8)(p11-12;q12), trisomía 8q e isocromosoma 8q– son las segundas en frecuencia (70-80% de los casos)[15]. El caso presentado mostraba un cariotipo complejo, destacando especialmente un isocromosoma 8q –i(8)(q10)– que supone un hallazgo frecuente en la LPL-T y cuya identificación como anomalía característica apoya el diagnóstico.

A nivel molecular, los genes de las cadenas beta y/o gamma del TCR se hallan reordenados de manera constante en la LPL-T[16], confirmando así la expansión clonal de linfocitos T y siendo particularmente llamativa la posible presencia de una doble población clonal T en el caso expuesto.

El diagnóstico diferencial debe plantearse en primer lugar con la LPL-B, de la que se diferencia por marcadores inmunológicos[1]. En segundo lugar, debe diferenciarse de otras neoplasias de células T maduras con expresión periférica, fundamentalmente: síndrome de Sézary, leucemia de linfocitos grandes granulares T y leucemia/linfoma T del adulto, para lo cual es crucial una integración de datos clínicos y de laboratorio[1,17]. En el caso aquí presentado, dadas sus particularidades inmunofenotípicas (CD45–), fue también necesario el diagnóstico diferencial con la leucemia linfoblástica aguda T[9], fundamentalmente a través del análisis morfológico y de citometría de flujo (CD34–, nuTdT–).

La LPL-T tiene un pronóstico desfavorable y una mediana de supervivencia de 1-2 años a pesar de las medidas terapéuticas actuales[2]. El tratamiento de elección es el anticuerpo monoclonal alemtuzumab (anti-CD52), que obtiene las mejores respuestas, aunque de carácter transitorio, con una progresión inevitable de la enfermedad[18]. Debe considerarse la realización de un TPH en aquellos pacientes candidatos que alcancen RC tras la inmunoterapia.

En conclusión, la circunstancia de que la LPL-T sea una enfermedad infrecuente, posea unas características citológicas definidas que establecen la sospecha diagnóstica fundamental y precise de una evaluación integrada de los datos clínicos y de laboratorio para su diagnóstico definitivo destaca la importancia y el interés del caso que se presenta, en el que, además, y de manera excepcional, un perfil citométrico atípico genera importantes discordancias, que son finalmente resueltas apoyándose siempre en la alta sospecha morfológica del frotis de sangre periférica, lo que permite avanzar en el proceso diagnóstico y confirmar finalmente la naturaleza específica de la enfermedad, en combinación con el resto de las pruebas complementarias.

› Conclusiones para recordar

- La LPL-T es una enfermedad de presentación infrecuente y que presenta unas características citológicas definidas, por lo que la evaluación del frotis de sangre periférica es una herramienta clave en la sospecha diagnóstica.
- El diagnóstico definitivo se basa en la combinación de los datos morfológicos, datos clínicos, inmunofenotípicos, histológicos, citogenéticos y de biología molecular, suponiendo un auténtico proceso de diagnóstico integrado.
- La ausencia de expresión de CD45 en la LPL-T supone una condición excepcional (5% de los casos) que debe ser tenida en cuenta, ya que implica posibles falsos negativos en el análisis citométrico y condiciona además el diagnóstico diferencial con neoplasias inmaduras de células T.

› Bibliografía

1. Dearden C. How I treat prolymphocytic leukemia. Blood. 2012;120:538-51.
2. Swerdlow S, Campo E, Harris N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. World Health Organization classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th edition. Lyon (France): IARC Press; 2017.
3. Matutes E, Brito-Babapulle V, Swansbury J, Ellis J, Morilla R, Dearden C, et al. Clinical and laboratory features of 78 cases of T-prolymphocytic leukemia. Blood. 1991;78:3269-74.
4. Sud A, Dearden C. T-cell Prolymphocytic Leukemia. Hematol Oncol Clin North Am. 2017;31:273-83.
5. Ravandi F, O'Brien S. Chronic lymphoid leukemias other than chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment. Mayo Clin Proc. 2005;80:1660-74.
6. Matutes E, Talavera GJ, O'Brien M, Catovsky D. The morphological spectrum of T-prolymphocytic leukaemia. Br J Haematol. 1986;64:111-24.
7. Dearden C. Management of prolymphocytic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2015;2015:361-7.
8. Jayakar V, Cheung K, Yebra-Fernández E, Bain BJ. The distinctive cytological features of T-cell prolymphocytic leukemia. Am J Hematol. 2017;92:830-2.
9. Chen X, Cherian S. Immunophenotypic characterization of T-cell prolymphocytic leukemia. Am J Clin Pathol. 2013;140(5):727-35.
10. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Dyer MJ, et al. Levels of expression of CD52 in normal and leukemic B and T cells: correlation with in vivo therapeutic responses to Campath-1H. Leuk Res. 1998;22:185-91.
11. Thakral B, Wang SA. T-cell prolymphocytic leukemia negative for surface CD3 and CD45. Blood. 2018;132:111.
12. Hu Z, Medeiros LJ, Fang L, Sun Y, Tang Z, Tang G, et al. Prognostic significance of cytogenetic abnormalities in T-cell prolymphocytic leukemia. Am J Hematol. 2017;92:441-7.
13. Maljaei SH, Brito-Babapulle V, Hiorns LR, Catovsky D. Abnormalities of chromosomes 8, 11, 14, and X in T-prolymphocytic leukemia studied by fluorescence in situ hybridization. Cancer Genet Cytogenet. 1998;103:110-6.
14. Brito-Babapulle V, Pomfret M, Matutes E, Catovsky D. Cytogenetic studies on prolymphocytic leukaemia: II. T cell prolymphocytic leukemia. Blood. 1987;70(4):926-31.
15. Costa D, Queralt R, Aymerich M, Carrió A, Rozman M, Vallespí T, et al. High levels of chromosomal imbalances in typical and small-cell variants of T-cell prolymphocytic leukemia. Cancer Genet Cytogenet. 2003;147(1):36-43.
16. Foroni L, Foldi J, Matutes E, Catovsky D, O'Connor NJ, Baer R, et al. Alpha, beta and gamma T-cell receptor genes: rearrangements correlate with haematological phenotype in T cell leukaemias. Br J Haematol. 1987;67:307-18.
17. Matutes E. T-cell prolymphocytic leukemia. Cancer Control. 1998;5:19-24.
18. Dearden CE, Matutes E, Cazin B, Tjønnfjord GE, Parreira A, Nomdedeu B, et al. High remission rate in T-cell prolymphocytic leukemia with CAMPATH-1H. Blood. 2001;98:1721-6.

Caso 5. Fiebre, dolor abdominal y pancitopenia en mujer de 53 años con antecedentes de linfoma folicular en remisión

Carlos Bravo-Pérez[1], Inmaculada Pajares[1], Myriam Castillo[1], Begoña Muiña[2], Hugo Escobar[3], M.ª Luz Amigo[1], Lorena Martínez-Montesinos[1], M.ª Dolores García-Malo[1], Francisco Martínez-Díaz[4], Jonathan García[5], María Socorro Rodríguez-Pinilla[6], Miguel Ángel Piris[6], Francisco José Ortuño[1]

[1] Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital General Universitario Morales Meseguer, Murcia; [2] Servicio de Hematología, Hospital Rafael Méndez, Lorca, Murcia; [3] Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Rafael Méndez, Lorca, Murcia; [4] Servicio de Anatomía Patológica, Hospital General Universitario Reina Sofía, Murcia; [5] Laboratorio de Citogenética, ATRYS Health, Barcelona; [6] Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Madrid

› Resumen del caso

Se presenta el caso de una mujer de 53 años con antecedentes de linfoma folicular en remisión, que es remitida a nuestro centro un año después del diagnóstico por fiebre, dolor abdominal y pancitopenia por sospecha de recaída precoz.

› Antecedentes médicos y familiares

Sin interés.

› Historia hematológica

La paciente es diagnosticada en noviembre de 2017 de linfoma folicular, grado histológico II, estadio IV-A, en su hospital local, a raíz de infecciones urinarias recurrentes, resistentes al tratamiento antibiótico y hematuria.

A la exploración física no se objetivaron adenopatías periféricas. Presentaba esplenomegalia de 3 cm por debajo del reborde costal. Analíticamente, no se apreciaron alteraciones en las pruebas de función renal, hepática ni en el proteinograma; la LDH fue de 189 UI/L (208-378 UI/L), la β2-microglobulina fue de 2,61 mg/L (0,8-2,2 mg/L), la proteína C reactiva fue de 1 mg/dL y la velocidad de sedimentación globular (VSG) de 5 mm en la primera hora. El hemograma, el frotis de sangre periférica y la coagulación fueron normales. Las serologías virales (virus de Epstein-Barr –VEB–, citomegalovirus –CMV–, virus de la hepatitis A –VHA–, B –VHB–, C –VHC– y virus de la inmunodeficiencia humana –VIH–) fueron negativas.

El estudio de tomografía computarizada (TC) de cuello a pelvis objetivó numerosas adenopatías supra- e infradiafragmáticas (submandibulares, laterocervicales, axilares, mediastínicas, mesentéricas, retroperitoneales, inguinales), así como esplenomegalia de 14,7 cm y una masa en el riñón izquierdo de 7,5 × 6 × 6 cm.

La biopsia de la masa renal objetivó infiltración extensa y difusa del intersticio renal ("en sábana"), ocasionalmente pseudonodular, por linfocitos atípicos de morfología centrofolicular, con abundantes centrocitos (de pequeño-mediano tamaño, citoplasma escaso y núcleo redondeado u ovoideo de cromatina densa, sin nucléolo evidente) y algunos centroblastos (de mayor tamaño, amplio citoplasma eosinófilo y un gran núcleo de cromatina laxa, con uno o varios nucléolos pequeños). También se identificaron figuras de mitosis, alguna de características atípicas. El estudio inmunohistoquímico de estos linfocitos atípicos fue positivo para CD20, CD79a, CD10, bcl2, bcl6 y CD23, y negativo para TdT, MUM1, ciclina D1, VEB, CD30, CD15, c-myc, p53, CD3, CD2, CD5 y CD7. El Ki67 fue del 20%. En las áreas pseudonodulares se apreció una trama reticular expandida (CD23+++/CD21+). Los hallazgos morfológicos e inmunohistoquímicos eran compatibles con el diagnóstico de linfoma folicular, grado histológico II. La hibridación *in situ* en el tejido demostró la presencia de la translocación t(14;18)(q32;q21) (Figura 1).

El estudio de extensión mediante tomografía por emisión de positrones (PET)/TC objetivó hipercapta-

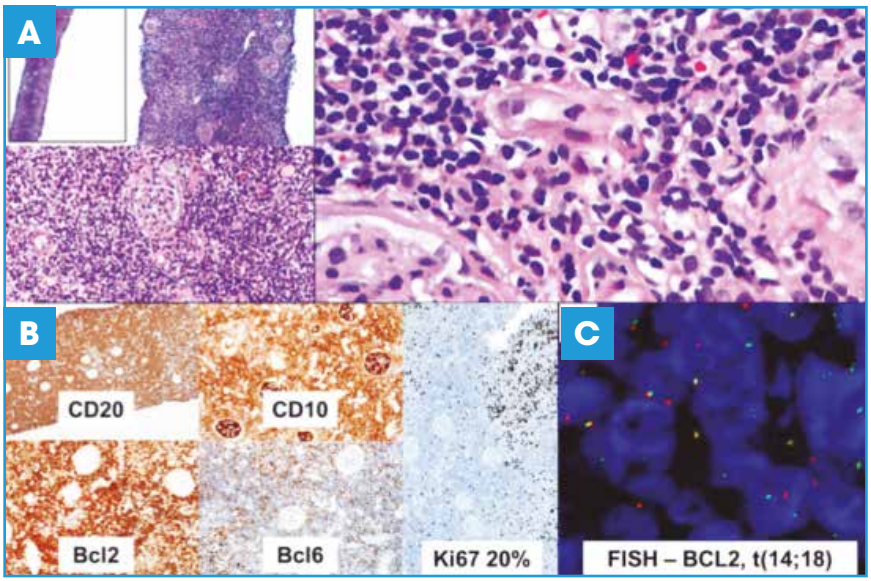


Figura 1. Imágenes de la biopsia renal al diagnóstico del linfoma folicular. A: hematoxilina-eosina (× 2, × 10, × 40, × 100); B: inmunohistoquímica positiva para CD20, CD10, Bcl2 y Bcl6; Ki67 del 20%; C: hibridación *in situ* (FISH) positiva para la t(14;18)(q32;q21).

ción en los territorios ganglionares previamente descritos en la TC y en la región renal izquierda, así como en el mango esternal y en el hueso iliaco. No se pudo efectuar estudio medular.

Con el diagnóstico de linfoma folicular de grado histológico II, estadio IV-A de Ann Arbor, se inició el tratamiento según el esquema R-CHOP × 6 ciclos (ciclofosfamida 750 mg/m^2, doxorubicina 50 mg/m^2, vincristina 1,4 mg/m^2 y prednisona 100 mg) junto con triple profilaxis intratecal (hidrocortisona 20 mg, metotrexato 12 mg, citarabina 30 mg) y que finalizó en mayo de 2018, objetivándose respuesta metabólica completa, con reducción o práctica desaparición de las adenopatías en todos los territorios afectados en la PET/TC de revaloración.

› Historia actual, exploración física y resumen de pruebas complementarias

En septiembre de 2018, la paciente ingresó nuevamente en su hospital local por fiebre de hasta 38 °C, junto con dolor abdominal, vómitos y diarrea, sin hallazgos relevantes a la exploración física. En la analítica se objetivó: AST 190 U/L (8-30 U/L), ALT 250 U/L (10-40 U/L), GGT 183 U/L (2-73 UI/L), fosfatasa alcalina 276 UI/L (120-390 UI/L) e hiperbilirrubinemia de 7,0 mg/dL (0,3-1,2 mg/dL); la LDH era de 463 U/L (208-378 UI/L), la β2-microglobulina de 3,72 mg/L (0,8-2,2 mg/L) y la proteína C reactiva de 15,9 mg/dL (< 0,04 mg/dL). El hemograma mostró pancitopenia: Hb 80 g/L (volumen corpuscular medio –VCM– 99 fL), plaquetas de 37 × 10^9/L y leucocitos de 0,8 × 10^9/L (< 1% de células atípicas). Se cursaron cultivos de sangre, orina y heces, siendo todos negativos. Los estudios serológicos frente a *Legionella spp., Chlamydia spp., Mycoplasma spp., Coxiella spp.* y *Leishmania spp.* también fueron negativos.

Se realizó una nueva TC de cuello a pelvis, en la que se objetivaron adenopatías subcentrimétricas mesentéricas, retroperitoneales, hepatomegalia y esplenomegalia (16,5 cm). Se realizó también una gastroscopia, que mostró un área pseupolipoidea de 6 mm en la curvatura mayor gástrica, así como erosiones parcheadas en la segunda porción del duodeno, de las que se tomaron sendas biopsias. Finalmente, se realizó un aspirado de médula ósea, del que solo se obtuvo sangre medular, con menos de un 1% de células atípicas.

A pesar del tratamiento antimicrobiano empírico con meropenem, teicoplanina, amikacina y anfotericina B liposomal, la paciente continuó con fiebre, objetivándose además empeoramiento de la clínica abdominal y marcado deterioro biológico, tanto bioquímico (LDH 1.700 UI/L) como hematológico, con empeoramiento de la pancitopenia y aparición de hasta un 11% de células atípicas en sangre periférica.

Con la sospecha de recaída precoz se traslada a nuestro centro. A su llegada, la paciente presentaba compromiso grave del estado general. A la exploración, destacaban palidez mucocutánea, hepatomegalia y esplenomegalia de 2 y 3 cm a través del reborde costal, respectivamente. No se palpaban adenopatías periféricas.

La analítica objetivó: AST 77 U/L, ALT 40 U/L, GGT 64 U/L, fosfatasa alcalina 497 U/L, bilirrubina total 0,90 mg/dL, ferritina 3.726 ng/mL; la LDH fue de 1.649 U/L. El hemograma mostró: hemoglobina (Hb) 76 g/L (VCM: 93,2 fL), plaquetas 22 × 10^9/L y leucocitos 0,88 × 10^9/L. En el frotis de sangre periférica se observó un 15% de células atípicas (Figura 2). Presen-

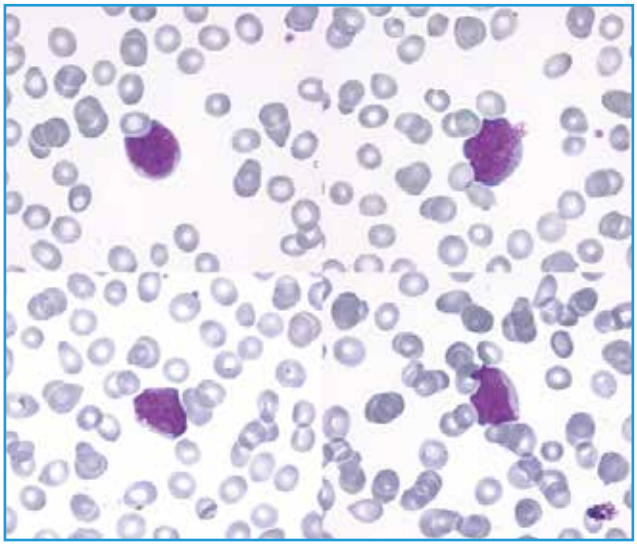


Figura 2. Citología de la extensión de sangre periférica. May-Grünwald-Giemsa (× 100).

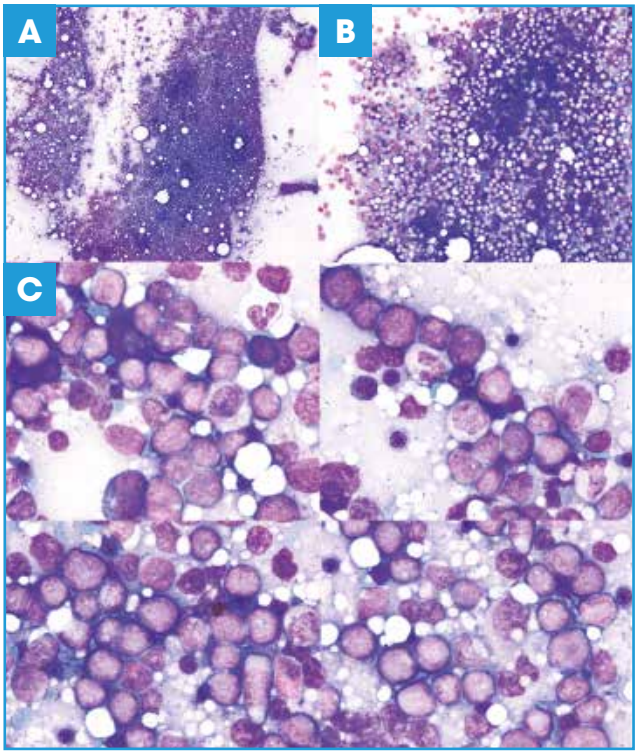


Figura 3. Citología de la impronta del cilindro de médula ósea. May-Grünwald-Giemsa (A: × 4; B: × 20; C: × 100).

taban tamaño heterogéneo, entre medio y grande, y muy alta relación núcleo/citoplasma. Los núcleos eran redondeados, algunos con cisuras o hendiduras, y presentaban una cromatina finamente reticulada, con uno o varios nucléolos de tamaño mediano. Los citoplasmas eran escasos, basófilos y sin granulación.

El aspirado medular fue blanco (*dry tap*). Se efectuaron improntas del cilindro de biopsia y se cursaron muestras de sangre periférica para estudios de inmunofenotipo, citogenético (cariotipo, hibridación *in situ*) y de biología molecular.

En las improntas se apreció infiltración masiva por células atípicas de características similares a las descritas en sangre periférica (Figura 3).

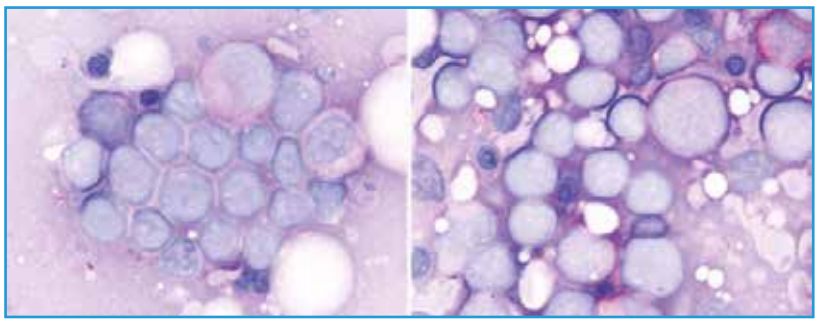


Figura 4. Citoquímica en la impronta del cilindro de médula ósea. PAS (× 100).

En algunas de estas células se apreciaban microvacuolas. La tinción de PAS fue considerada negativa, aunque se intuía microgranulación PAS positiva en algunos elementos de gran tamaño (Figura 4).

El estudio inmunofenotípico en sangre periférica objetivó la existencia de una población, sobre un 5%, de elementos con baja dispersión frontal y angular de luz, con un fenotipo positivo para CD45, CD19, CD22, CD10 débil (con una intensidad media de fluorescencia de 27), CD81, bcl2, TdT y cadenas µ citoplasmáticas (citµ). Mientras que fue negativa la expresión de CD20, CD79b, FMC7, sIg (inmunoglobulinas de superficie), CD11c, CD34 y CD117, así como de marcadores mieloides (mieloperoxidasa, CD33, CD13, CD15, CD14, CD11b) y linfoides T (CD2, CD3, CD5, CD7) (Figura 5).

El estudio de hibridación *in situ* en la muestra de sangre periférica mostró positividad para el reordenamiento *BCL2* t(14;18)(q32;q21) (sonda doble color/doble fusión) y *MYC* (8q24) (sonda *break apart*), con negatividad para los reordenamientos de *BCL6* (3q27) (sonda *break apart*) y *MYC* t(8;14)(q24;q32) (sondas doble color/doble fusión) (Figura 6). El cariotipo en la muestra de sangre periférica reveló: 46,XX,t(8;22)(q24;q11),t(14;18)(q32;q21)[16]/46,idem,add(15)(q24)[6] (Figura 7).

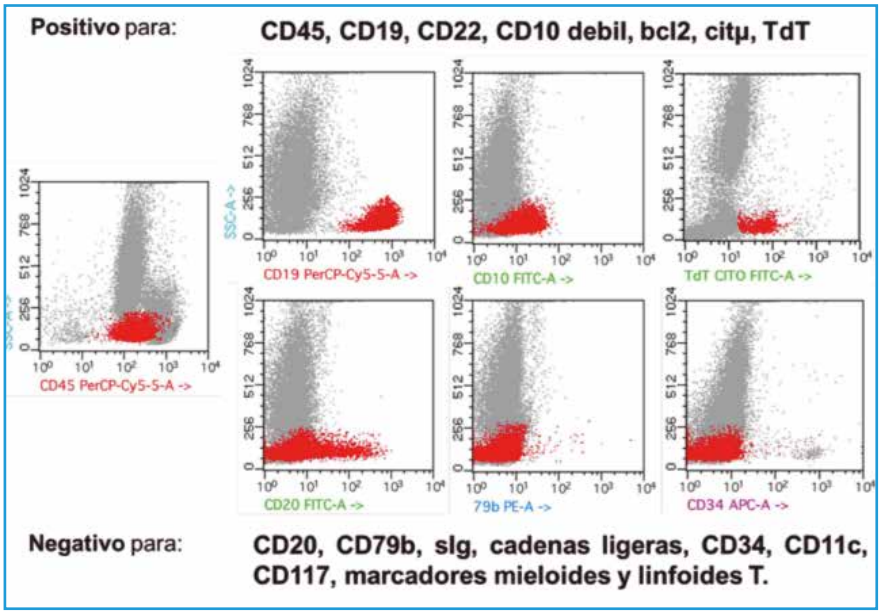


Figura 5. Inmunofenotipo mediante citometría de flujo en sangre periférica.

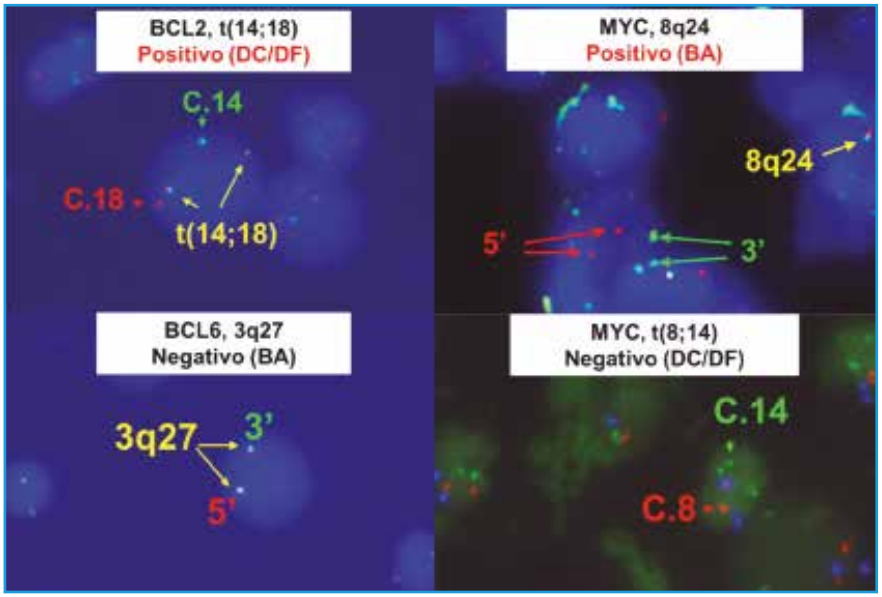


Figura 6. .Hibridación *in situ* en sangre periférica. Translocación t(14;18)(q32;q21) *IGH-BCL2* (*DC/DF*): positivo. Reordenamiento 3q27 *BCL6* (BA): negativo. Reordenamiento 8q24 *MYC* (*BA*): positivo. Translocación t(8;14)(q24;q32) *MYC-IGH* (DC/DF): negativo. *BA*: sonda *break-apart*; *DC/DF*: sonda doble color/doble fusión.

El estudio anatomopatológico de la biopsia duodenal describía ocupación de la lámina propia por linfocitos atípicos de pequeños y mediano tamaño, con cromatina de aspecto blástico, escaso citoplasma y numerosas imágenes de mitosis y apoptosis. La inmunohistoquímica fue positiva para PAX5, CD79a, TdT, CD10, bcl2 y c-myc (80-90%), y negativa para CD20, MUM1, bcl6, ciclina D1, CD20, CD43, CD3, CD5, CD34 y citoqueratina AE1/3, todos los marcadores de línea T y CD34. El Ki67 fue del 80% (Figura 8).

Finalmente, el estudio anatomopatológico de la biopsia de médula ósea objetivó infiltración masiva por elementos de aspecto blástico, con nucléolo central. La inmunohistoquímica fue positiva para CD45, CD79a débil, CD10, bcl2, CD99, TdT y negativa para CD34, CD20, MUM1, ciclina D1, CD68, bcl6, CD138, glicoforina A y marcadores mieloides y linfoides T. El Ki67 fue del 90% (Figura 9).

› Diagnóstico definitivo

Leucemia/Linfoma de precursores B con hallazgos citogenéticos de doble *hit*, reordenamiento de BCL2 y de MYC, variante t(8;22)(q24;q11).

› Tratamiento y evolución

Se inició tratamiento de inducción según el protocolo de alto riesgo de PETHEMA (LAL-AR/2011: vincristina 1,5 mg/m^2 días 1, 8, 15 y 22; daunorubicina 45 mg/m^2 días 1, 8, 15 y 22; prednisona 60 mg/m^2 días 1 a 14, 30 mg/m^2 días 15 a 21 y 15 mg/m^2 días 21 a 28; y L-asparaginasa 10.000 UI/m^2 días 16-20, 23-27). El estudio medular del día +14 objetivó la persistencia de una infiltración del 20% a expensas de elementos con la misma morfología, inmunofenotipo y alteraciones citogenéticas que las objetivadas en el estudio previo.

La paciente reingresó 4 semanas después de finalizar el tratamiento por deterioro marcado del estado general y astenia. El hemograma objetivó leucocitos de 25,1 × 10^9/L con más de un 90% de células atípicas

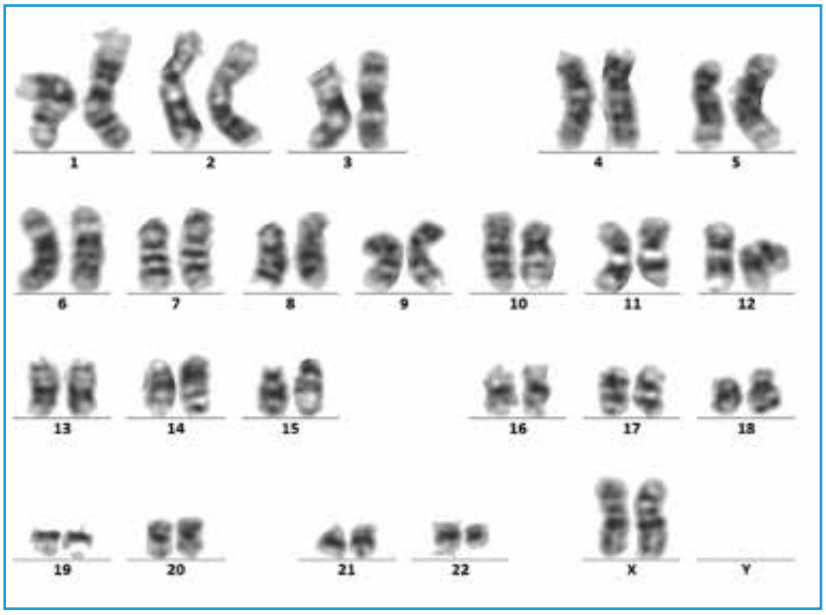


Figura 7. Cariotipo en sangre periférica. El cariotipo mostró la siguiente fórmula cromosómica: 46,XX,t(8;22)(q24;q11), t(14;18)(q32;q21)[16]/46,idem,add(15)(q24)[4].

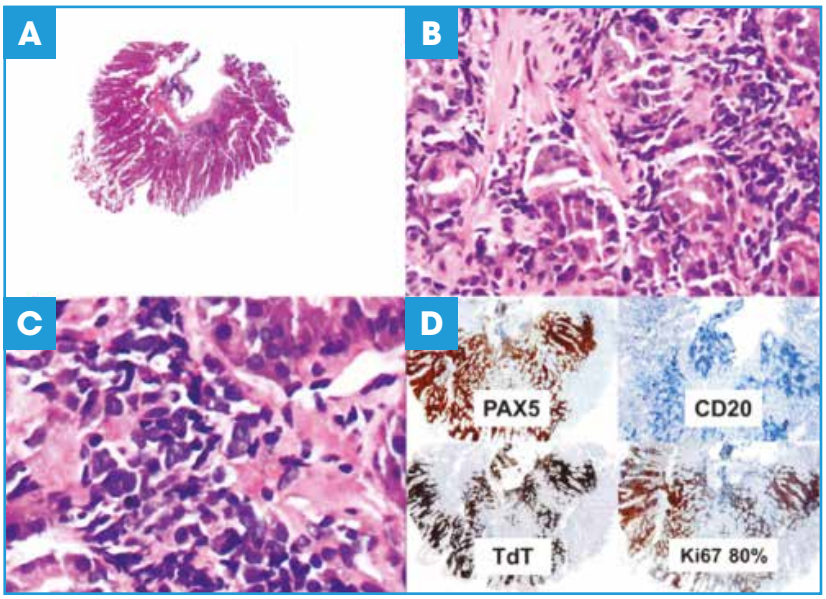


Figura 8. Imágenes de la biopsia duodenal. A-C: hematoxilina-eosina (A: × 2, B: × 40, C: × 100); D: inmunohistoquímica positiva para PAX5 y TdT, y negativa para CD20, Ki67 del 20%.

y una LDH de 29.000 U/L (208-378 UI/L), y falleció 5 días después por una hemorragia intraabdominal masiva debida a una rotura esplénica.

Con carácter retrospectivo, se realizó un estudio molecular del reordenamiento de los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas en las muestras de la biopsia renal al diagnóstico del linfoma folicular y en la sangre periférica en el momento de la progresión con fase leucémica. En ambos casos, se objetivó una posición similar (en nucleótidos) de los picos de ambos casos de reordenamiento: 255,4 *vs.* 260,2 para *FR2* en las muestras renal y de sangre periférica, respectivamente; y 121,2 *vs.* 124,9 para *FR3* en la misma comparación (Figura 10). Dichos hallazgos fueron altamente sugestivos de clonalidad (transformación linfoblástica).

› Discusión

Se presenta el caso de una paciente diagnosticada previamente de linfoma folicular, grado histológico II, estadio IV-A, que progresa 4 meses después de finalizar la inmunopoliquimioterapia de primera línea a expensas de una neoplasia de células linfoides que infiltra el tracto gastrointestinal, la médula ósea y desarrolla fase leucémica, con células B de aspecto inmaduro, pérdida de expresión de antígenos de línea B (CD20 y CD79b), nueva expresión de TdT y hallazgos citogenéticos de doble *hit*, variante t(8;22) de reordenamiento de *MYC*.

Los anteriores hallazgos, siendo muy infrecuentes, obligan a plantear las siguientes opciones:

- ¿Se trataba de un linfoma folicular transformado posteriormente a una leucemia linfoblástica B con hallazgos citogenéticos de doble *hit*?
- ¿Se trataba de un linfoma folicular que evolucionó a un linfoma B de alto grado doble *hit*, con pérdida de expresión antigénica y expresión aberrante de TdT?
- ¿Se trataba en realidad de un linfoma B de alto grado *single hit* al debut que respondió mal al tratamiento y posteriormente progresó, pero en forma de un doble *hit* con pérdida de expresión antigénica B y expresión aberrante de TdT?

En la reciente revisión de la clasificación de las neoplasias linfoides de la Organización Mundial de

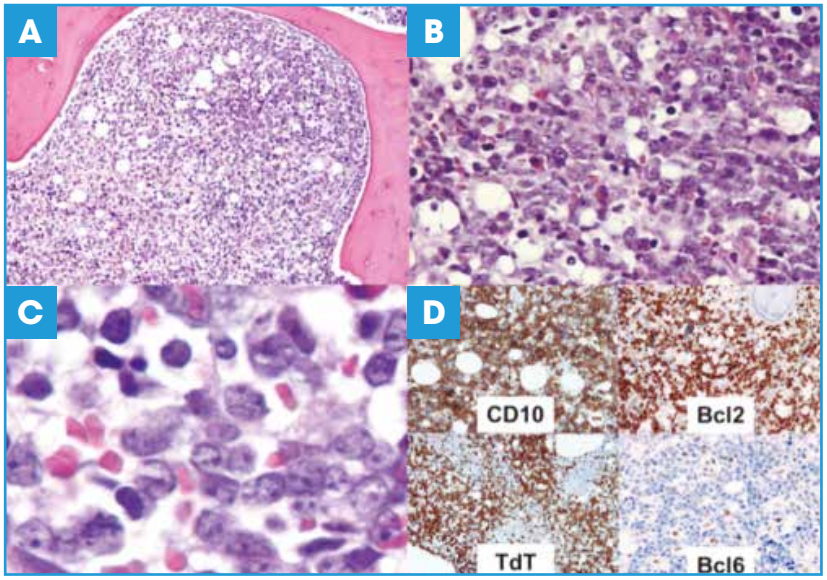


Figura 9. Cariotipo en sangre periférica. El cariotipo mostró la siguiente fórmula cromosómica: 46,XX,t(8;22)(q24;q11), t(14;18)(q32;q21)[16]/46,idem,add(15)(q24)[6]

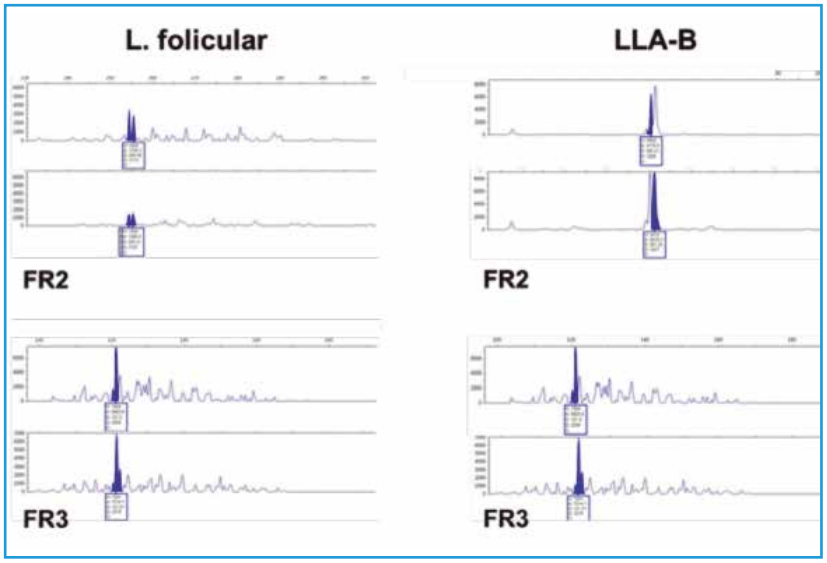


Figura 10. Reordenamiento de los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. En las muestras al diagnóstico (linfoma folicular) y a la progresión (LLA-B), se objetivó una posición similar (en nucleótidos) de los picos de ambos casos de reordenamiento. Dichos hallazgos fueron altamente sugestivos de clonalidad.

la salud (OMS) de 2017, el linfoma de alto grado de células B doble/triple *hit* (*HGBCL-DH/TH*) queda definido por el reordenamiento del protooncogén *MYC* (8q24) –tanto en su forma más frecuente con el gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (14q32) como alternativamente con los genes de las cadenas ligeras kappa (2p12) o lambda (22q11)– combinado con las translocaciones concurrentes de *BCL2* y/ o *BCL6*[1]. En la descripción de dicha entidad, se acepta que, si bien en la mayoría de los casos la morfología se corresponde con la de un linfoma B difuso de célula grande (o, con menor frecuencia, con la de un linfoma de Burkitt o intermedia entre ambas), también puede presentarse raramente con una morfología de tipo leucemia linfoblástica B o, incluso, de tipo linfoma folicular.

Un reciente estudio que evaluaba una serie de 13 casos de *HGBCL-DH/TH*[2] encontraba expresión de TdT en 4 pacientes. Tres casos presentaban morfología centroblástica y el otro morfología de tipo Burkitt; este último caso además presentaba el diagnóstico previo de linfoma folicular. Los 4 tenían reordenamiento de *BCL2* y 3 lo tenían de *BCL6*; el caso con diagnóstico previo de linfoma folicular fue *BCL6* negativo. En todos se detectó reordenamiento de *MYC* por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con la sonda t(8;14)(q24;q32). Interesantemente, solo en uno se detectó en el cariotipo la translocación t(8;14)(q24;q32), mientras que en 2 se detectó la variante t(8;22)(q24;q11) (incluyendo el caso con diagnóstico previo de linfoma folicular). En el cuarto no se hallaron alteraciones de 8q24. La presentación clínica y la evolución fueron heterogéneas en los 4 sujetos: un paciente fue *exitus letalis* 2 semanas después del diagnóstico, el caso con diagnóstico previo de linfoma folicular fue refractario primario al tratamiento inmunopoliquimioterápico y los 2 restantes estaban libres de enfermedad después de recibir R-HyperCVAD, seguido de trasplante autólogo en un caso y alogénico en otro. Es de destacar que en el paciente de esta serie con similares características al presentado, es decir, diagnóstico previo de linfoma folicular, positividad de TdT y CD10, negatividad de CD20 y sIg, reordenamiento de *BCL2* y de *MYC* con t(8;22)(q24;q11), se estableció el diagnóstico de leucemia linfoblástica B[2].

Es relevante que muchos de los casos descritos en la literatura para *HGBCL-DH/TH* y positividad de TdT, ade-

más de presentar morfología y datos de fenotipo de leucemia linfoblástica B (por ejemplo, positividad de CD10 y/ o CD99, expresión débil o negativa de CD45 y ausencia de sIg), tengan un diagnóstico previo de linfoma folicular[3-5]. Por otra parte, la transformación de un linfoma folicular en leucemia linfoblástica B es un hallazgo raro pero bien documentado, añadiéndose en la mayoría de los casos descritos el reordenamiento de MYC al de BCL2, como ocurría en nuestro caso[2,6-8]. En este sentido, es destacable la propuesta de caracterizarlos como una entidad diferenciada bajo el epígrafe "transformación linfoblástica de un linfoma folicular"[6].

Con una perspectiva diferente y, en oposición a las actuales recomendaciones de la OMS de catalogar como leucemia linfoblástica B todos los casos con positividad para TdT, algunos autores han descrito:

• Casos *de novo* con morfología y fenotipo *HGBCL* sin diagnóstico previo de linfoma no Hodgkin.

• Casos con diagnóstico previo de linfoma folicular y morfología y fenotipo *HGBCL-DH*, con reordenamiento de *MYC* y *BCL2*.

• Casos con diagnóstico previo de linfoma no Hodgkin sin reordenamiento de *BCL2*, con aparición de TdT en progresión.

En conjunto, estos autores proponen diferenciar los casos con positividad para TdT y citogenética doble *hit*, basándose tanto en la baja frecuencia de reordenamientos de *MYC*, *BCL2* y/o *BCL6* en las leucemias linfoblásticas B *de novo* típicas, como en su diferente y más agresivo comportamiento, más parecido al de los *HGBCL-DH/TH* que al de las leucemias linfoblásticas B[9]. En este sentido, abogan por reconsiderar las actuales recomendaciones categorizantes de la OMS sobre TdT y, a la vista de su posible positividad en neoplasias B maduras como un fenómeno epigenético aislado[6] y, en contextos citológicos y fenotípicos que apoyen el diagnóstico de *HGBCL*, proponen establecer la categoría "linfoma de alto grado TdT-positivo", con 2 subgrupos diferenciados, como el "linfoma blástico B con reordenamientos de *MYC, BCL2* y/o *BCL6*" y la "leucemia/linfoma de precursores B transformado desde un linfoma folicular"[9].

El hallazgo de vinculación clonal en la evolución de linfoma folicular a leucemia linfoblástica B puede parecer contraintuitivo. Sin embargo, estudios recientes de transdiferenciación, desdiferenciación y plasticidad de línea de los linfocitos B maduros han esclarecido su base patogénica[6]. En este sentido, aunque el linfoma folicular es una neoplasia de linfocitos B maduros, se ha sugerido que la linfomagénesis con la adquisición de la t(14;18) podría no iniciarse en el centro germinal, sino en los precursores tempranos B de la médula ósea en la fase inicial del reordenamiento VDJ[10]. En consecuencia, la transformación linfoblástica del linfoma folicular podría explicarse por:

• La existencia de un precursor B inmaduro portador del reordenamiento t(14;18)(q24;q32) en médula ósea, común a ambos procesos, que se altera de manera secuencial y/o divergente, adquiriendo lesiones en *MYC*.

• La adquisición de alteraciones en *MYC* AID-dependientes durante reentradas sucesivas en el centro germinal de células de memoria afectadas de t(14;18)(q24;q32)[11-13].

Con el fin de validar nuestra hipótesis, estudiamos las cadenas pesadas de inmunoglobulinas mediante técnicas moleculares tanto en la fase de linfoma folicular como en la de leucemia/linfoma de precursores B; en ambas muestras se encontraron reordenamientos aunque en diferentes *framework regions* (*FR*). La gran similitud (aunque no igualdad) de la longitud de los amplicones objetivados tanto en *FR2* como en *FR3* nos hizo pensar que en realidad ambas fases de la enfermedad tenían un mismo reordenamiento. Este hallazgo refuerza, a nuestro ver, la hipótesis de evolución clonal entre ambas fases de la enfermedad.

En resumen, y en respuesta a las preguntas con las que iniciábamos la discusión, se trata de una paciente diagnosticada de un linfoma folicular transformado a una entidad que fenotípicamente sugería una leucemia linfoblástica B, por la expresión de TdT, CD10 y CD99, así como por la pérdida de CD20 y sIg, y que genéticamente presentaba una segunda translocación *driver* que afectaba a *MYC*. El diagnóstico definitivo fue el de una leucemia/linfoma de precursores B con doble *hit* (transformación linfoblástica de linfoma folicular), proceso clínica y biológicamente distinto a la leucemia linfoblástica B *de novo* y que, probablemente, requiera un tratamiento diferenciado y más agresivo.

› Conclusiones para recordar

1. La expresión de TdT en pacientes con diagnóstico previo de neoplasias B maduras obliga a una revaluación inmunofenotípica y citogenética (cariotipo y FISH), esta última dirigida más específicamente al estudio de reordenamientos de *MYC*, *BCL2* y *BCL6*.

2. El hallazgo de doble *hit* en neoplasias linfoides de línea B, aunque más frecuentemente asociado a HGB-CL, obliga a descartar el diagnóstico de leucemia/linfoma de precursores B.

3. El hallazgo simultáneo de fenotipo compatible con leucemia/linfoma de precursores B con doble *hit* se acompaña de una clínica específica y más agresiva que las leucemias linfoblásticas *de novo* clásicas y, probablemente, requiere un abordaje terapéutico diferenciado.

4. Los diagnósticos complejos, como el presente caso, hacen necesaria la integración de los hallazgos moleculares, citogenéticos, fenotípicos y cito/histológicos, y obligan a la fusión de los hallazgos hematológicos y patológicos.

› Bibliografía

1. Kluin P, Harris NL, Stein H, Leoncini L, Campo E, Jaffe ES, et al. High grade B-cell lymphoma. En: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J (eds.). WHO classification of tumours of hematopoietic and lymphoid tissue. WHO IARC Press; 2017. pp. 335-41.
2. Moench L, Sachs Z, Aasen G, Dolan M, Dayton V, Courville EL. Double- and triple-hit lymphomas can present with features suggestive of immaturity, including TdT expression, and create diagnostic challenges. Leuk Lymphoma. 2016;57:2626-35.
3. Thangavelu M, Olopade O, Beckman E, Vardiman JW, Larson RA, McKeithan TW, et al. Clinical, morphologic, and cytogenetic characteristics of patients with lymphoid malignancies characterized by both t(14;18)(q32;q21) and t(8;14)(q24;q32) or t(8;22)(q24;q11). Genes Chromosomes Cancer. 1990 Jul;2(2):147-58.
4. Kroft SH, Domiati-Saad R, Finn WG, Dawson DB, Schnitzer B, Singleton TP, Ross CW. Precursor B-lymphoblastic transformation of grade I follicle center lymphoma. Am J Clin Pathol. 2000 Mar;113(3):411-8.
5. Sun X, Gordon LI, Peterson LC. Transformation of follicular lymphoma to acute lymphoblastic leukemia. Arch Pathol Lab Med. 2002;126:997-8.
6. Geyer JT, Subramaniyam S, Jiang Y, Elemento O, Ferry JA, de Leval L, et al. Lymphoblastic transformation of follicular lymphoma: a clinicopathologic and molecular analysis of 7 patients. Hum Pathol. 2015;46:260-71.
7. De Jong D, Voetdijk BM, Beverstock GC, van Ommen GJ, Willemze R, Kluin PM. Activation of the c-myc oncogene in a precursor-B-cell blast crisis of follicular lymphoma, presenting as composite lymphoma. N Engl J Med. 1988 May 26;318(21):1373-8.
8. Young KH, Xie Q, Zhou G, Eickhoff JC, Sanger WG, Aoun P, Chan WC. Transformation of follicular lymphoma to precursor B-cell lymphoblastic lymphoma with c-myc gene rearrangement as a critical event. Am J Clin Pathol. 2008 Jan;129(1):157-66.
9. Ok CY, Medeiros LJ, Thakral B, Tang G, Jain N, Jabbour E, et al. High-grade B-cell lymphomas with TdT expression: a diagnostic and classification dilemma. Mod Pathol. 2019;32(1):48-58.
10. Roulland S, Faroudi M, Mamessier E, Sungalee S, Salles G, Nadel B. Early steps of follicular lymphoma pathogenesis. Adv Immunol. 2011;111:1-46.
11. Slot LM, Hoogeboom R, Smit LA, Wormhoudt TA, Biemond BJ, Oud ME, et al. B-Lymphoblastic Lymphomas Evolving from Follicular Lymphomas Co-Express Surrogate Light Chains and Mutated Gamma Heavy Chains. Am J Pathol. 2016 Dec;186(12):3273-84.
12. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, Ben-Neriah S, Woods R, Steidl C, et al. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. Blood. 2009;114:2273-9.
13. Mamessier E, Broussais-Guillaumot F, Chetaille B, Bouabdallah R, Xerri L, Jaffe ES, Nadel B. Nature and importance of follicular lymphoma precursors. Haematologica. 2014;99:802-10.

Caso 6. Niño de 5 años con fiebre, dolores óseos, leucocitosis y hepatoesplenomegalia

Laura Lo Riso[1], Alejandro Formica[1], Marta García[2], Bernardo López[1], Julio Iglesias[3], Mikael Lorite[4], José María Sánchez Raga[2], Antonia Sampol[2], José Antonio Salinas[4], María Antonia Durán[1]

[1]Unidad de Diagnóstico Hematológico, Servicio de Hematología y Hemoterapia. [2]Servicio de Hematología y Hemoterapia. [3]Servicio de Inmunología. [4]Servicio de Pediatría. Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca

› Motivo de consulta

Se trata de un niño de 5 años remitido a nuestro centro por sospecha de leucemia aguda.

› Historia clínica

El paciente es un niño de 5 años sin antecedentes patológicos ni familiares de interés que acudió a Urgencias por astenia, fiebre y artralgias intermitentes. En los últimos meses había presentado varias infecciones de manejo ambulatorio.

En la exploración física presentaba palidez cutánea y equimosis en ambos miembros inferiores. Se palpaba hepatomegalia de 1,5 cm y esplenomegalia de 15 cm por debajo del reborde costal. No se palpaban adenopatías.

› Pruebas complementarias

› *Análisis de laboratorio*

• Hemograma: leucocitos 291.000 × 10^9/L, hemoglobina 7,03 g/dL, hematocrito 24%, volumen corpuscular medio (VCM) 72,4 fL, plaquetas 113.000 × 10^9/L.

• Fórmula leucocitaria: segmentados 48%, metamielocitos 15%, bandas 14%, mielocitos 8%, promielocitos 6%, mieloblastos 1%, monocitos 2%, basófilos 0,5% eosinófilos 0,5%, linfocitos 5%.

• Bioquímica: función hepática, renal e iones con valores dentro de los rangos de normalidad, LDH sérica 1.302 U/L (normal: 192-321), PCR 3.22 mg/dL (normal: 0,0-0,5), ferritina 314 ng/mL (normal: 20-274), vitamina B_{12} > 2.000 pg/mL (normal: 87-883), ácido fólico 5,70 ng/mL (normal: 3,1-20,5).

• Coagulación: AP 75% (normal: 70-120), tiempo tromboplastina parcial activado (TTPa) 27,6 segundos (normal: 25,7-40,1).

• Hormonas: TSH 2.41 µUI/mL (normal: 0,7-4,17), T4 1,09 ng/dL (normal: 0,7-1,48), PTH 32 pg/mL (normal: 16-65).

• Dosificación de inmunoglobulinas: IgG 862 mg/dL (normal: 500-1.400), IgA 129 mg/dL (normal: 50-180), IgM 58 mg/dL (normal: 50-200).

• Estudios microbiológicos: las serologías contra los virus de Epstein-Barr (VEB), del sarampión y de la varicela zóster fueron positivas para IgG. Las serologías contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), lúes, hepatitis B y C fueron negativas.

• Se realizaron hemocultivos seriados que fueron negativos.

› *Pruebas de imagen*

• Se realizó una tomografía computarizada (TC) toracoabdominal (Figura 1) que mostraba esplenomegalia de 16 cm con efecto masa sobre el riñón izquierdo y sobre las asas intestinales. Pequeña cantidad de líquido libre perihepático, periesplénico y en la fosa iliaca derecha. Además, se observaban lesiones en la médula ósea (MO) de ambos húmeros y en el fémur izquierdo sugestivas de infiltración por proceso hematológico.

• La TC craneal fue normal, sin evidencia de lesiones ocupantes de espacio ni otras alteraciones.

• Se realizó también una ecografía de los testículos, que fue normal.

Figura 1. Tomografía computarizada (TC) toracoabdominal: se aprecia esplenomegalia masiva y hepatomegalia leve.

› *Estudios citológicos y citometría de flujo*

• **Morfología de sangre periférica:**

– La serie roja mostraba anisopoiquilocitosis e hipocromía marcada. Presencia de 7 eritroblastos/100 leucocitos.

– La serie leucocitaria mostraba leucocitosis con desviación a la izquierda. Morfológicamente, podía observarse hipogranulación y alteración de la segmentación de células polinucleadas.

– Tras observar la morfología de sangre periférica, el cuadro se orientó como posible síndrome mieloproliferativo (SMP)/mielodisplásico (SMD) *versus* leucemia mieloide crónica (LMC) atípica.

• **Inmunofenotipo de sangre periférica.** Se observó la presencia de un 1% de blastos mieloides (CD34+, CD33+, CD13+, DR+, CD117+) y presencia de formas inmaduras de la serie granulocítica. Un 1% de los monocitos tenía un fenotipo maduro (CD64+, CD14+)

• **Mielograma:**

– La MO era hipercelular con incremento de la cantidad de megacariocitos e hiperplasia granulopoyética con desviación a la izquierda. Se observaban un 8% de blastos mieloides y morfológicamente no había evidencia de eosinofilia, basofilia ni monocitosis.

– La mayoría de los megacariocitos era de pequeño tamaño, hipolobulados o en "suelta de globos" y destacaban abundantes micro-megacariocitos (Figura 2).

– La serie mieloide presentaba rasgos displásicos marcados: abundantes células con hipercondensación de la cromatina y alteración de la segmentación nuclear, formas pseudo-Pelger o en rosquilla; también destacaban la hipogranulación y la alteración de la distribución de la granulación en todos los estadios madurativos (Figura 3).

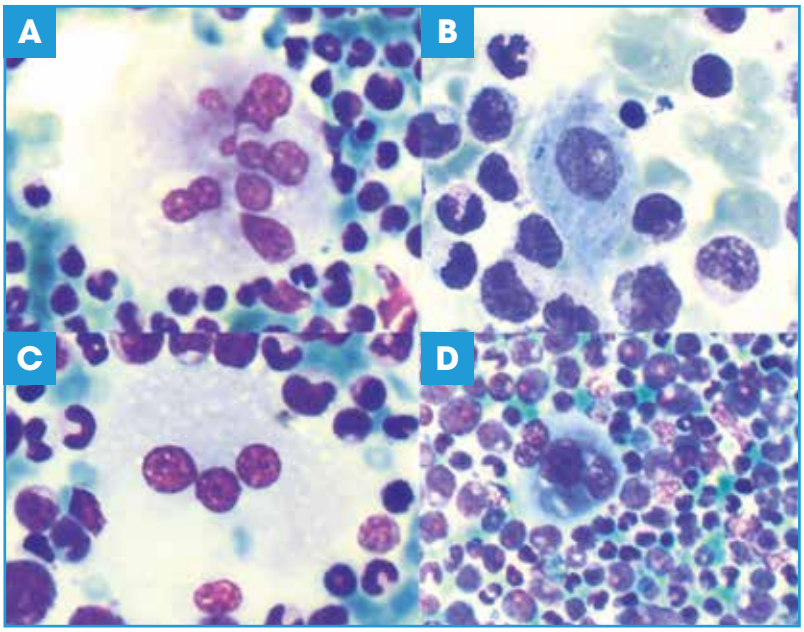


Figura 2. Morfología de médula ósea: dismegacariocitopoyesis con megacariocitos en suelta de globo (A,C) y micromegacariocitos (B,D). May-Grünwald-Giemsa × 100.

– La serie eritroide presentaba una marcada diseritropoyesis con presencia de abundantes núcleos de perfil irregular, eritroblastos binucleados y punteado basófilo (Figura 4).

– La tinción de Perls no mostraba incremento del hierro medular ni sideroblastos patológicos.

• **Estudio de citometría de flujo en muestra de MO**. Se observó un 4% de mieloblastos (CD34+ DR+ CD117+ CD33+ CD13+). La serie granulocítica presentaba baja complejidad celular y curvas de maduración de aspecto anormal (CD11b/CD13; CD16/CD13). La serie monocítica representaba el 2% de la celularidad (1% madura: CD64+ CD14+; 1% inmadura: CD64+ CD14 negativo).

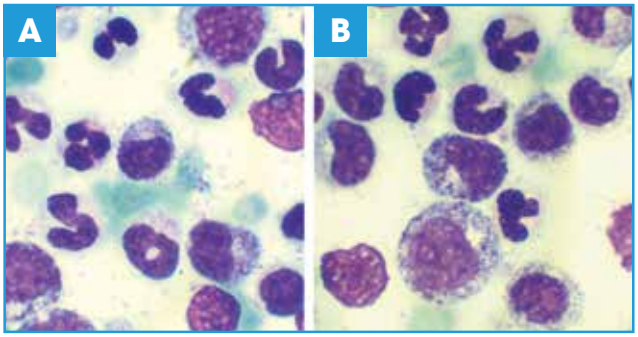


Figura 3. Morfología de médula ósea: se observa disgranulopoyesis en todos los estadios madurativos, marcada hipercondensación nuclear (*clumpling*) y segmentación anómala de los núcleos de los polimorfonucleares neutrófilos. Se observa un neutrófilo en rosquilla (A). May-Grünwald-Giemsa × 100.

• **Estudio genético-molecular de MO:**

– El estudio citogenético (Figura 5) reveló la presencia de una trisomía 8 en todas las 20 metafases analizadas, como única alteración.

– El estudio del reodenamiento BRC-ABL1 por sonda de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), y el estudio por PCR de los tránscritos p210 y p190, fueron negativos.

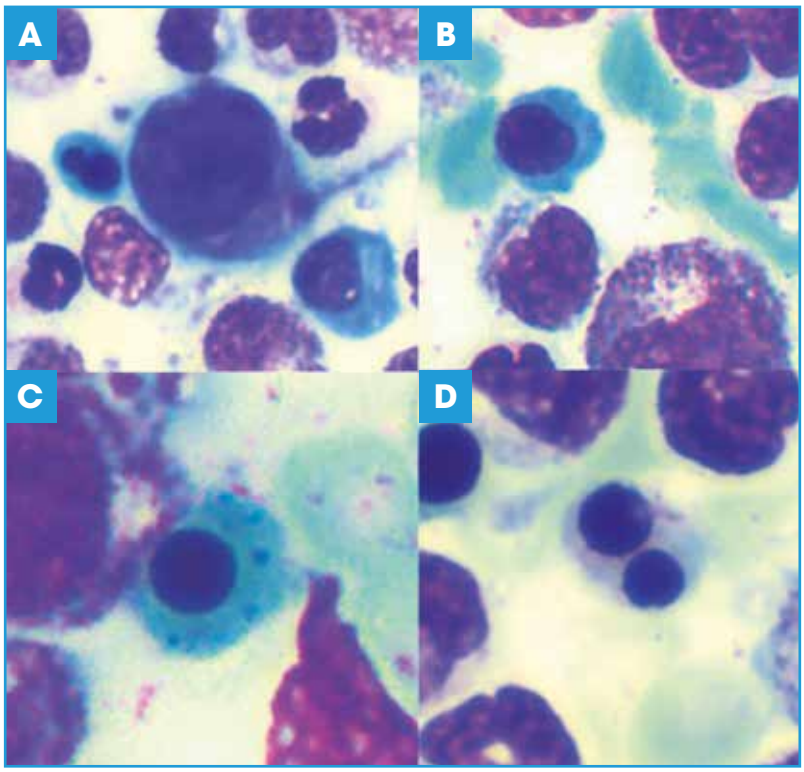


Figura 4. Morfología de médula ósea. Presencia de diseritropoyesis marcada: eritroblasto binucleado (A, D), alteración del contorno nuclear (B), punteado basófilo (C). May-Grünwald-Giemsa × 100.

– También fue negativo el estudio de las mutaciones FLT3-ITD/FLT3-TKD, NPM1, JAK2 V617F, CSF3R, PDGRFα, PDGRFβ, FGFR1, IDH2, SF3B1 y ASXL1, realizadas mediante PCR.

Tras el resultado negativo del reordenamiento BRC-ABL1, se orientó el caso hacia una LMC atípica, por lo que se amplió el estudio molecular por PCR del gen SETBP-1, que demostró la presencia de la mutación c.2602G>A/p.D868N.

El diagnóstico definitivo fue de **LMC atípica**, al cumplir los criterios de esta entidad que figuran en la revisión de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2016.

› Evolución

Se instauró tratamiento citorreductor con hidroxiurea y profilaxis del síndrome de lisis tumoral bajo vigilancia en la Unidad de Cuidados Intensivos, presentando el paciente buena evolución clínica y analítica.

Tras el diagnóstico definitivo, se contactó con el centro de referencia donde se realizó posteriormente un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) de sangre de cordón por falta de donante HLA-idéntico. Debido a que hubo un fallo de implante del cordón, se realizó un trasplante haploidéntico del padre, con buena evolución hasta la actualidad.

› Discusión

La LMC atípica es una rara patología hematológica que, según la clasificación de la OMS de 2016, está incluida dentro de la categoría SMD/neoplasias mieloproliferativas (NMP), al compartir características de ambas entidades[1].

Su incidencia es muy baja, se diagnostican solamente 1-2 casos/100 casos de LMC Filadelfia positivas y frecuentemente en la sexta o séptima década de la vida, siendo los casos pediátricos extremadamente raros[1].

La supervivencia descrita en las series más numerosas es de 14-29 meses[1], siendo la evolución a leucemia aguda a corto plazo la causa más frecuente de muerte.

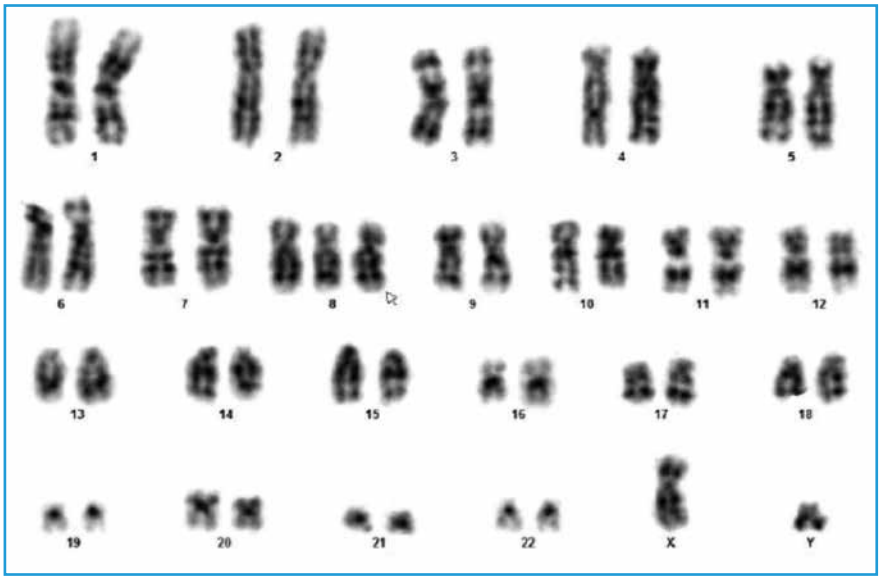


Figura 5. Cariotipo realizado en muestra de médula ósea: 47,XY, + 8[20]. El paciente presentaba la trisomía 8 en todas las metafases analizadas.

La edad superior a 65 años, la leucocitosis superior a 50 × 10^9 células/L, el sexo femenino y la presencia de precursores mieloides en sangre periférica superiores al 10% son los factores pronósticos negativos más significativos[2]. En nuestro caso, el paciente presentaba 2 de los 4 criterios adversos descritos.

Frecuentemente y, como en el caso de nuestro paciente, el cuadro clínico y analítico es similar al de la LMC típica, presentando los pacientes esplenomegalia, leucocitosis, desviación izquierda y MO hipercelular. Pero la ausencia del cromosoma Filadelfia en el cariotipo, la ausencia de tránscritos BCR-ABL1 y la presencia de rasgos displásicos en la sangre periférica la diferencian de esta entidad[3].

En ocasiones, como en nuestro caso, la displasia puede ser multilineal y se pueden apreciar abundantes micromegacariocitos o rasgos marcados de diseritropoyesis[1], entre otras alteraciones.

En relación con el diagnóstico diferencial con otras entidades mieloproliferativas, tuvimos que considerar y descartar los diagnósticos de leucemia neutrofílica crónica (LNC) y de leucemia mielomonocítica juvenil (LMMC). Para poder diferenciar estas entidades, es conveniente recordar que la presencia en sangre periférica de un porcentaje superior al 10% de células mieloides inmaduras (promielocitos, mielocitos, metamielocitos) y/o la displasia mieloide diferencian la LMC atípica de la LNC[4], mientras que la ausencia de monocitos marcada (cifra de monocitos inferior al 10%) en sangre periférica y en la MO ayudan a diferenciarla de la LMMC, entidad con la que sí comparte alteraciones morfológicas[4].

Los criterios de la clasificación de la OMS de 2016 para el diagnóstico de la LMC atípica, que nuestro paciente cumplía en su totalidad, son[1]:

a) Leucocitosis circulante con incremento de neutrófilos y precursores mieloides superior al 10%, asociado a rasgos displásicos como disgranulopoyesis o cromatina hipercondensada (*clumping*).

b) MO hipercelular con proliferación granulocítica y displasia.

c) Mínima o ausente basofilia, inferior al 2% en sangre periférica.

d) Mínima o ausente monocitosis, inferior al 10% en sangre periférica.

e) Blastos inferiores al 20% en sangre periférica o MO.

f) Ausencia de reordenamientos BCR/ABL1, PDGFRα, PDGFRβ y FGFR1.

g) Ausencia de criterios diagnósticos para LMC BCR/ABL+, mielofibrosis primaria, policitemia vera o trombocitemia esencial.

A nivel citogenético, la presencia de alteraciones varía entre un 20 y un 88%, y las más frecuentes son la trisomía 8, la pérdida de un cromosoma 5 o de un cromosoma 7, la deleción del cromosoma 20q o la presencia del isocromosoma 17.

Ninguna de estas alteraciones parece ser recurrente o específica de la LMC atípica, dato que complica el reto diagnóstico[4].

El perfil molecular ha sido detallado en la última década gracias a las nuevas técnicas de secuenciación masiva y a la realización de estudios de exomas completos en pacientes con patologías mieloides.

Respecto a las mutaciones más frecuentes en las NMP (JAK2, CALR y MPL), solo la JAK2V617F ha sido descrita en el 4-8% de las LMC atípicas, pero por su baja frecuencia es poco probable su implicación en la patogénesis de la LMC atípica.

Las mutaciones de RAS (KRAS y NRAS) fueron de las primeras en ser relacionadas con la LMC atípica, con una positividad entre el 10 y el 30% de los casos[5].

Recientemente, los estudios sobre mutaciones de SETBP1, CSF3R y ENTK1 han contribuido de forma sig-

Mutation	Prevalence
SETBP1	10-48%
NRAS	10-30%
KRAS	8-10%
JAK2	4-8%
CSF3R	< 10%
ASXL1	20-70%
ETNK1	8%
TET2	16-30%
SRSF2	12-40%
EZH2	8-14%
RUNX1	6-12%
CBL	8-10%
FLT3	5%
CEBPA	4%

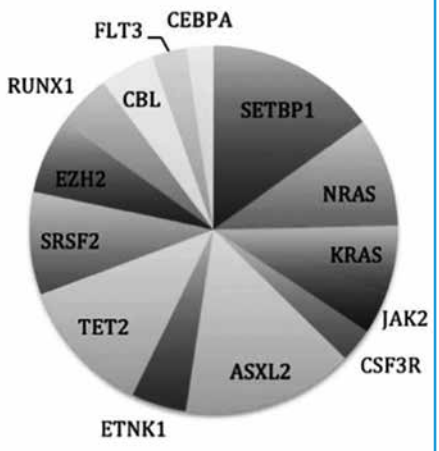


Figura 6. Resumen de la frecuencia mutacional en leucemia mieloide crónica atípica[4]. Destaca el amplio porcentaje de prevalencia de la mutación en el gen *SETBP-1* entre las mutaciones más específicas de la enfermedad.

nificativa en la comprensión de la fisiopatología de la LMC atípica[6-8].

En 2013, la mutación somática en el gen *SETBP1* (cromosoma 18q21.1) fue identificada a raíz del estudio del exoma completo de 8 pacientes con diagnóstico de LMC atípica. Tras la resecuenciación dirigida en 574 pacientes con diferentes neoplasias mieloides, se identificó la presencia de la mutación de *SETBP1* en el 24,3% de pacientes con LMC atípica (n = 70)[6].

El gen *SETBP1* codifica la proteína homónima de expresión ubiquitaria, que regula de forma negativa la expresión de la proteína supresora de tumores *fosfatasa 2A* (PP2A); la mutación en el gen *SETBP1* se traduce en una estabilización de la proteína SET con inhibición de la PP2A y aumento de la proliferación celular[6].

Estudios posteriores han demostrado que mutaciones en SETBP1 se relacionan con un perfil clínico más agresivo (mayor leucocitosis, anemia y trombocitopenia) tanto en las LMC atípica como en las LMMC con SETBP1 mutada[6,8].

La mutación de CSF3R, en particular la T6181, en un primer momento fue observada hasta en el 40% de las LMC atípica, pero estudios sucesivos han limitado su presencia a menos del 10%[9,10].

En 2015 se describió la presencia de mutaciones del gen *ETNK1* en aproximadamente el 9% de los pacientes con LMC atípica y en el 3% con LMMC. Por primera vez se observó cómo las mutaciones somáticas de *ENTK1* podían conducir a la pérdida de la actividad catalítica de la etanolamina cinasa 1, enzima involucrada en la biosíntesis de fosfolípidos, mantenimiento de la membrana celular y de la correcta citocinesis[11], favoreciendo el desarrollo de la patología.

A pesar de que nuestro paciente cumpliera por completo los criterios de la OMS de LMC atípica y a pesar de que no exista una mutación específica y patognomónica de la enfermedad, los resultados del estudio genético y molecular que demostraron la mutación SETBP1 y la presencia de la trisomía 8 han sido de gran importancia para confirmar el diagnóstico. Además, hasta la actualidad no se ha descrito en la literatura ningún caso de LMC atípica pediátrica con presencia de mutación en SETBP1.

En la Figura 6 se muestra la frecuencia de las mutaciones detectadas en la LMC atípica[4].

› Tratamiento

En la actualidad, las características genéticas y clínicas de esta entidad, junto con la falta de ensayos clínicos aleatorizados, hacen difícil la realización de pautas estandarizadas para el manejo y el tratamiento de estos pacientes.

Como en otras entidades poco frecuentes, se recomienda siempre que sea posible incluir los pacientes en ensayos clínicos.

En general, el manejo de la LMC atípica, al igual que en otros SMD/NMP inclasificables, incluye la consideración del trasplante de células madres hematopoyéticas en primera línea.

La elección del TPH en primera línea está justificada por el mal pronóstico y la rápida evolución a leucemia aguda, pero una porción considerable de pacientes no se puede beneficiar de esta opción debido a la edad, las comorbilidades, etc.

Recientemente, se han publicado varios análisis retrospectivos de TPH en pacientes con LMC atípica. La serie de casos más amplia reportada hasta la actualidad es la de Onida, que analiza los resultados de 42 pacientes, diagnosticados entre 1996 y 2006, que presentan una supervivencia global del 51% a los 5 años[4].

Hay que destacar que, en pacientes sin claras alteraciones genéticas, la persistencia de marcadores moleculares a los 6 meses post-TPH ha sido relacionada con mayores tasas de recaídas, reforzando la importancia de realizar un estudio molecular completo al diagnóstico para poder realizar el seguimiento de la enfermedad mínima residual postratamiento[4].

Entre las opciones terapéuticas para pacientes no candidatos a TPH y que necesiten un control rápido de los síntomas (esplenomegalia, anemia, leucocitosis o síndrome constitucional) se han descrito el uso de la terapia citorreductora con hidroxiurea, los agentes hipometilantes, los agentes estimulantes de la eritropoyetina y el interferón (IFN) alfa.

La hidroxiurea es la terapia más utilizada para el control de la leucocitosis en pacientes paliativos o como terapia puente al TPH. Respecto a los hipometilantes, la decitabina ha sido la más documentada[3].

El uso de IFN alfa ha sido relacionado con respuesta hematológica parcial y completa, pero sus efectos secundarios en muchos casos han determinado la suspensión del tratamiento[3].

La esplenectomía y la irradiación esplénicas son técnicas desaconsejadas debido a la alta tasa de complicaciones y su uso se debería restringir a casos muy seleccionados.

Actualmente, la ampliación de los estudios moleculares con la secuenciación masiva en los SMD/NMPc ha creado las bases para la investigación de nuevas terapias dirigidas. El inhibidor de JAK2 ruxolitinib, aprobado para el tratamiento de la mielofibrosis o policitemia vera resistente/intolerante a la hidroxiurea, está siendo estudiado en varios ensayos clínicos de fase II con pacientes afectos por SMD/NMPc, LMC atípica o LMMC, que presenten o no mutación de CSF3R[3].

Otros fármacos con buen potencial terapéutico en estudio son dasatinib, inhibidor de cinasa de la familia SRC, y trametinib, inhibidor de MEK1/2, moléculas relacionadas con alteraciones de señalización intracelular afectadas por las mutaciones de CSF3R[4].

› Conclusiones para recordar

1. La LMC atípica es un diagnóstico extremadamente raro en la edad pediátrica pero, a pesar de esto, hay que tenerla en cuenta ante la presencia de una leucocitosis acompañada de displasia.

2. La correcta interpretación de la morfología, tanto en la sangre periférica como en la MO, es imprescindible para enfocar el diagnóstico en los síndromes de solapamiento SMD/NMP.

3. La realización de estudios genéticos y moleculares ampliados es fundamental para el correcto diagnóstico, el tratamiento y para el seguimiento de la enfermedad mínima residual.

› Bibliografía

1. Orazi A, Bennett JM, Brain BJ, Brunning RD, Thiele J. Atypical chronic myeloid leukemia, BCR-ABL1 negative. 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. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017. pp. 87-9.
2. Breccia, Biondo F, Latagliata R, Carmosino I, Mandelli F, Alimena G. Identification of risk factors in atypical chronic myeloid leukemia. Haematologica. 2006;91:1566-8.
3. Gotlib J. How I treat atypical chronic myeloid leukemia. Blood. 2017;129:838-45.
4. Schwartz L, Mascarenhas J. Current and evolving understanding of atypical chronic myeloid leukemia. Blood Rev. 2019;33:74-81.
5. Zoi K, Cross NCP. Molecular pathogenesis of atypical CML, CMML, and MDS/MPN-unclassificable. Int J Hematol. 2015;101:229-42.
6. Piazza R, Valletta S, Winkelmann N, Redaelli S, Spinelli R, Pirola A, et al. Recurrent SETBP1 mutations in atypical myeloid leukemia. Nat Genet. 2013;45:18-24.
7. Meggendorfer M, Bacher U, Alpermann T, Haferlach C, Kern W, Gambacorti-Passerini C, et al. SETBP1 mutations occur in 9% of MDS/MPN and in 4% of MPN cases and are strongly associated with atypical CML, monosomy 7, isochromosome i(17)(q10), ASXL1 and CBL mutations. Leukemia. 2013;27:1852-60.
8. Piazza R, Magistroni V, Redaelli S, Mauri M, Massimino L, Sessa A, et al. SETBP1 induces transcription of a network of development genes by acting as an epigenetic hub. Nature Communications. 2018;9(1):1-13.
9. Meggendorfer M, Haferlach T, Alpermann T, Jeromin S, Haferlach C, Kern W, et al. Specific molecular mutation patterns delineate chronic neutrophilic leukemia, atypical chronic myeloid leukemia, and chronic myelomonocytic leukemia. Haematologica. 2014;99:244-6.
10. Maxson JE, Gotlib J, Pollyea DA, Fleischman AG, Agarwal A, Eide CA, et al. Oncogenic CSF3R mutations in chronic neutrophilic leukemia and atypical CML. N Engl J Med. 2013;368:1781-90.
11. Gambacorti-Passerini CB, Donadoni C, Parmiani A, Pirola A, Redaelli S, Signore G, et al. Recurrent ENTK1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. Blood. 2015;125(3):499-503.
12. Kosmider O. Mutations of ENTK1 in aLMC, and LMMC. Blood. 2015;125:422-3.

SMD & CHIPS (CLONAL HEMATOPOIESIS OF INDETERMINATE POTENTIAL)

Coordinadores:

Dr. Francesc Solé Ristol
Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras. Barcelona
Dr. Xavi Calvo González. Hospital del Mar/Parc de Salut Mar. Barcelona

El primer ponente de esta sesión es el **Dr. David Steensma** (Harvard, Boston, USA), que fue el que propuso el término de "clonal hematopoiesis of indeterminate potential" (CHIP) para describir un estado en el que una mutación somática de un gen "driver" asociado a la leucemia está presente en una frecuencia alélica (VAF) de al menos el 2% en un paciente que no cumple los criterios para ser diagnosticado de una neoplasia hematológica. Luego se definió el término "age-related clonal hematopoiesis" (ARCH) que no fija un nivel de VAF determinado. Todas estas definiciones se engloban dentro del concepto de "clonal hematopoiesis" (CH), que se define como la expansión clonal de células de la sangre derivadas de una única célula madre hematopoyética.

Los estudios genómicos han demostrado que CHIP está presente en el 10-15% de la población de 70 años y en el 30% en la de los 85 años. El ponente describe que los factores de riesgo relacionados con la presencia de CHIP incluyen la edad, fumar, una variante germinal del gen *TERT*, y otras variantes germinales relacionadas con genes de reparación celular. La CH puede ocurrir después de un tratamiento con radio o quimioterapia en un paciente con un tumor sólido, o después de un trasplante de médula ósea, y por ello su detección tiene implicaciones clínicas.

Los siguientes ponentes, **Dra. Sara Álvarez y Dr. Juan Cruz Cigudosa** (NIMGenetics, Madrid) presentan un resumen de la evidencia actual con respecto a la relevancia de la NGS para el diagnóstico, a través del conocimiento de los procesos moleculares que conducen al CHIP y a la evolución clonal hacia los SMDs y las LMAs secundarias. En su ponencia se discutirá la importancia de la metodología para diagnosticar y hacer el seguimiento de dichos pacientes, así como la importancia de conocer también que pacientes son portadores de una mutación germinal. Otro punto que se comentará es el de las firmas genéticas asociadas a progresión, en la que los primeros estudios indican que la progresión viene condicionada por el número de variantes como el tamaño del clon así como el gen implicado. Tal como concluye la Dra. Álvarez, la CHIP, "es una condición pre-maligna, común en los adultos mayores asociada con conjunto específico de variantes, más comúnmente en los genes *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *TP53* y *SF3B1*, lo que sugiere que estos genes son clave en el inicio de la enfermedad".

Por último, la **Dra. Blanca Xicoy** (Hospital ICO-Germans Trias i Pujol, Badalona), nos presentará un resumen de las implicaciones y seguimiento clínico del paciente con CHIP. La CH "es uno de los descubrimientos más importantes de los últimos años en la biología del envejecimiento, la hematología y la patología cardiovascular". La detección de mutaciones tiene relevancia clínica ya que confieren un riesgo 10 veces mayor y anual del 1% de desarrollar una neoplasia hematológica maligna y además implica un riesgo aumentado de tener eventos cardiovasculares con una tasa de muerte 4 veces mayor. Tal como comenta la Dra. Blanca Xicoy: "Hemos entrado en la era genómica, y cada vez más pacientes tendrán datos moleculares paralelos a sus datos clínicos, ambos modificables con el tiempo. En este escenario entran en juego aspectos éticos y legales no del todo cubiertos hasta ahora, y por ello es importante la colaboración de cómo mínimo genetistas, hematólogos y cardiólogos, para que el profesional se sienta seguro, por un lado, en la integración de la información clínica y genética y, por otro lado, en la comunicación de esta (el qué y el cómo) al paciente que, por cierto, es libre de querer conocer o no".

El último conferenciante, la **Dra. María Zurdo** del Hospital General Universitario Morales Meseguer de Murcia que representa una de las mejores comunicaciones de SMD. Se trata de un trabajo realizado en colaboración con miembros del GESMD en el que se presentan las diferencias transcriptómicas y proteómicas en los componentes del inflamosoma entre la LMMC y SMD. Presentan por primera vez evidencias de una hiperactivación en LMMC respecto a los SMD de los componentes del inflamosoma, y dicha hiperactivación responde a un mecanismo transcripcional génico, que en el caso de los dos genes más sobre expresados, CCL2 y CCL7, se asocia a la presencia de mutaciones en el gen *TET2*.

Estamos seguros que el diagnóstico de CHIP o ARCH, pre-enfermedad o condición pre-maligna, … será cada vez más frecuente, principalmente por el aumento de la edad media de la población y ello llevará asociado un aumento del número de individuos que sufrirán un proceso oncológico o cardiovascular. Estamos al inicio de conocer las implicaciones del diagnóstico de CHIP y será importante definir las herramientas diagnósticas y de seguimiento, así como establecer guías clínicas para el manejo de dichos pacientes o individuos. El debate está abierto.

Fundamentos y conceptos básicos. SMD y CHIP

David Steensma
Dana-Farber Cancer Institute, Boston, USA

While technically all hematopoiesis is clonally derived, "clonal hematopoiesis (CH)" is used as shorthand to describe an expansion of blood cells derived from a single hematopoietic stem cell. Clonality is a defining feature of hematological cancers, but recently CH was also found to be a frequent and perhaps inevitable consequence of aging. We proposed the term "clonal hematopoiesis of indeterminate potential" (CHIP) to describe the specific state in which a somatic mutation in a driver gene associated with leukemia is present, and this mutation is present at a variant allele frequency (VAF) of at least 0.02 (2%), yet the patient does not meet World Health Organization diagnostic criteria for a hematological neoplasm.

The term age-related clonal hematopoiesis (ARCH) is also widely used and does not have a specific VAF or definition. ARCH may be universal; CHIP is present in ~ 10-15% of people aged 70 years and more than 30% by age 85, and represents a precursor state for neoplasia akin to monoclonal gammopathy of undetermined significance.

CHIP is also an important risk factor for cardiovascular events, with accumulating evidence supporting a mechanism of accelerated atherogenesis as a result of NLRP3-inflammasome-mediated vascular inflammation driven by clonally-derived monocytes and macrophages.

This is an exciting observation because such inflammation is amenable to therapy, and indeed a recent 10,000 patient trial with canakinumab *versus* placebo in patients who previously had a myocardial infarction and have a C reactive protein > 2 showed reduction in a composite cardiovascular endpoint with canakinumab, with the greatest benefit seen in those with CHIP.

Clonal states are also now being detected in multiple other tissues. Risk factors for CHIP include aging, male sex, cigarette smoking, a common germline variant in the telomere-associated gene *TERT*, and several other germline variants such as a DNA repair defect. CH can also occur after cytotoxic chemotherapy or radiation for a solid tumor, after hematopoietic stem cell transplant, in the context of aplastic anemia, or after induction chemotherapy for acute leukemia; in each setting, CH has distinct clinical implications.

La vida en un CHIP. CHIP y leucemias secundarias

Sara Álvarez de Andrés, Juan Cruz Cigudosa
NIMGenetics, Parque Científico de Madrid

› *Abstract*

El desarrollo de la secuenciación masiva nos ha permitido la caracterización molecular de un espectro de trastornos mieloides que van desde la hematopoyesis clonal de significado indeterminado (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential* –CHIP–) hasta la leucemia mieloide aguda secundaria (LMA secundaria). En las fases iniciales las alteraciones moleculares se observan con relativa frecuencia en individuos sanos como consecuencia del envejecimiento. La adquisición de otras variantes oncogénicas es el origen molecular de estadios preleucémicos y leucémicos como los síndromes mielodisplásicos (SMD) o las LMA. Este patrón molecular define la mayoría de las características clínicas y patológicas de estas hemopatías. Más de 50 genes mutados recurrentemente están involucrados en la patogénesis, la progresión y la transformación de los SMD, incluyendo genes que codifican proteínas involucradas en el *splicing*, la regulación epigenética y la transcripción.

El objetivo de esta revisión es proporcionar un resumen de la evidencia actual con respecto a la relevancia de la *next-generation sequencing* (NGS) para el diagnóstico, a través del conocimiento de los procesos moleculares que conducen al CHIP y a la evolución clonal hacia los SMD y las LMA secundarias.

› Introducción

La leucemogénesis es un proceso gradual en el que se observa una diversificación molecular y una selección clonal de células madre neoplásicas. El desarrollo de estas hemopatías puede comenzar en diferentes etapas de la vida e incluir diferentes estadios de progresión, que se desarrollarán a lo largo de años o incluso décadas[1]. La secuenciación masiva nos ha permitido identificar que incluso antes del desarrollo de un SMD, en presencia de recuentos hematológicos normales, se pueden detectar una o más variantes somáticas, que *per se* (como lesión aislada) exhiben un bajo potencial oncogénico, pero que determinan la presencia de una hematopoyesis clonal[2]. Mientras las células neoplásicas conserven todo su potencial de diferenciación y maduración, y puedan ser controladas por el nicho y el sistema inmunológico, los clones involucrados permanecerán indolentes y, con el tiempo, podrán reemplazar o incluso imitar parcialmente al órgano normal en términos funcionales y morfológicos. Sin embargo, tan pronto como los clones dominantes escapen de los mecanismos de control, la enfermedad se expandirá y transformará hacia hemopatías más agresivas[3].

› La secuenciación masiva en la práctica clínica

El término secuenciación masiva define un conjunto de diferentes tecnologías que permiten la secuenciación en paralelo de múltiples genes en un conjunto de muestras, generalmente de varios individuos. Esta tecnología cada vez más asequible se ha ido incorporando, en los últimos años, a la práctica clínica. Las plataformas de secuenciación disponibles se pueden clasificar en función de la longitud media de lectura (larga o corta); del modo de secuenciación, que incluye la secuenciación de extremo único (los fragmentos de ADN se secuencian en un solo extremo, *single-end sequencing*) y la secuenciación de ambos extremos del fragmento con lecturas pareadas (*paired-end sequencing*); y de la tecnología de secuenciación empleada (secuenciación por ligación, hibridación o síntesis, principalmente)[4]. Actualmente, los equipos de secuenciación con mayor implantación son los de Illumina (San Diego, CA, USA) y Thermo Fisher Scien-

tific (Waltham, MA, USA). En ambos secuenciadores, las muestras procesadas serán incluidas en un chip, para su secuenciación en paralelo. Posteriormente, el procesamiento bioinformático de los resultados nos permitirá identificar los cambios propios de cada uno de los individuos analizados.

Las diferencias en coste entre la secuenciación de un genoma (WGS), un exoma (WES) o un panel dirigido (donde solo se secuencian las regiones de interés) son significativas. La utilización de paneles es la aproximación de elección en oncohematología, dado que permite secuenciar a alta profundidad un grupo seleccionado de genes con implicaciones clínicas establecidas, lo que asegura la identificación de variantes en clones minoritarios[4].

Actualmente, disponemos de una extensa oferta de paneles comerciales y la posibilidad de diseñar paneles *ad hoc* (*custom panels*). Algunos de los parámetros que debemos tener en cuenta para su selección son:

- Contenido en genes. Se han identificado más de 50 genes recurrentemente mutados en la patogénesis de los SMD.
- Tipos de variantes detectables. Los diseños de los paneles y los algoritmos de análisis pueden permitir no solo la identificación de las SNV (*single nucleotide polymorphisms*) e *indels* (inserciones y deleciones), sino también ganancias y pérdidas, comúnmente denominadas CNV (*copy number variants*) o proteínas de fusión (resultado de la presencia de translocaciones).
- Cobertura o porcentaje de cada gen que es secuenciado. Esta información nos permite determinar si el gen de interés está completamente secuenciado o si el panel incluye solo aquellas regiones donde las variantes son más recurrentes (*hotspots*).
- Profundidad o número de lecturas por base. Las recomendaciones para estos estudios son de 500× (media de 500 lecturas por base analizada), lo que asegura la identificación de variantes con un VAF* (*variant allele frequency*) de al menos un 2%. El término VAF indica la frecuencia con la que se ha identificado un cambio en una determinada posición nucleotídica respecto al número de veces que se ha leído esa posición. Con una profundidad de 500× y un VAF del 2% el cambio se habrá observado al menos en 10 lecturas.

Los resultados obtenidos deben ser interpretados por genetistas moleculares para una adecuada categorización de variantes, en función de las guías establecidas.

› Hematopoyesis clonal de significado incierto

El término CHIP describe la presencia de variantes somáticas clonales con un VAF superior al 2% en ausencia de citopenias persistentes (definido como un periodo superior a 4 meses) o evidencias morfológicas de hemopatía. Los pacientes con CHIP no cumplen los criterios diagnósticos de los SMD incluso si el tamaño del clon es significativo. Esta situación está presente en el 10-15% de los mayores de 70 años y en más del 30% de los mayores de 85 años[2].

La secuenciación masiva es la técnica de elección para la identificación de estas alteraciones. Los clones de células hematopoyéticas con VAF inferior al 2% no se consideran actualmente como CHIP, ya que su prevalencia es aún mayor y su impacto clínico sigue siendo incierto. Las variantes identificadas en las CHIP también se pueden detectar en pacientes con neoplasias mieloides (como SMD o LMA secundarias), por lo que no son consideradas específicas, si bien el número de variantes y su VAF son distintos en las diferentes patologías. En la mayoría de los casos de CHIP se observa una sola variante, siendo el cambio citosina-timina el más frecuente. Esta transición es considerada el cambio somático más asociado al envejecimiento. En las CHIP las variantes se localizan fundamentalmente en los genes *DNMT3A*, *TET2* y *ASXL1*, y con menor frecuencia en *SF3B1* y *TP53*. Los genes implicados en las modificaciones postranslacionales del ADN y las histonas son esenciales en la regulación epigenética asociada a la diferenciación celular y la capacidad de autorrenovación[2,5,6]. Asimismo, es importante señalar que en estos casos la VAF habitualmente no supera el 10%.

Aunque la mayoría de las hematopoyesis clonales son secundarias a variantes somáticas, es importante recordar que se ha descrito un conjunto de síndromes familiares, asociados a una predisposición a desarrollar una neoplasia mieloide, en los que las variantes oncogénicas están presentes en la línea germinal. En estos síndromes las hemopatías se desarrollan fundamentalmente en la adolescencia y la juventud, y la firma genética observada implica cambios en genes como *CBL*, *CEBPA*, *ETV6*, *GAT2*, *MPL*, *NF1*, *PTPN11*, *RUNX1* o *TP53*, no observándose variantes en los genes previamente asociados al envejecimiento y a la CHIP[5]. Por tanto, estos se distinguen claramente de los CHIP en función de los genes implicados y la VAF, que en la mayoría se observa cercana al 50%, si bien se reco-

mienda su estudio en un tejido para definir su origen somático o germinal.

› Firmas genéticas asociadas a progresión

Las variantes somáticas asociadas a la hematopoyesis clonal son habitualmente persistentes y no desaparecen espontáneamente. La presencia de una CHIP es un predictor de desarrollo de una hemopatía maligna, con un riesgo anual del 0,5-1%, similar a lo observado en las gammapatías monoclonales de significado incierto y superior al de la población general[2].

La transformación a SMD desde una CHIP se asocia a un perfil genético de mayor complejidad, observándose generalmente al menos 2 variantes, con frecuencias alélicas más altas y con la adquisición de variantes en familias de genes asociadas a otras funciones. Así, la adición de variantes en genes implicados en el *splicing* (como *SF3B1*, *SRSF2* o *U2AF1*) parece asociarse de un modo más determinístico a la presencia de displasia morfológica. Recientemente, en función de la identificación de una firma genética a partir del estudio de 40 genes, se ha demostrado que el estudio del perfil genético en sangre periférica de las citopenias persistentes permite determinar el riesgo de progresión. Se ha identificado que tanto el número de variantes como el tamaño del clon, definido por la frecuencia alélica de las variantes, tienen un valor predictivo significativo. Otro elemento que predice la transformación es el gen implicado. La presencia de variantes, especialmente en *SF3B1*, así como en otros genes implicados en el *splicing*, debe considerarse como predictora de progresión. Estos resultados ponen de manifiesto la utilidad de la realización de estudios de secuenciación en la evaluación de los pacientes con citopenias persistentes[7].

La LMA es una neoplasia mieloide clonal que surge típicamente *de novo*; sin embargo, algunos casos evolucionan a partir de un estado preleucémico, como el SMD. Las LMA secundarias y aquellas con características clínicas típicas relacionadas con los SMD son conocidas como las LMA con cambios relacionados con la mielodisplasia (*myelodyplasia related changes* –MRC–). La progresión a una LMA desde un SMD se caracteriza por la adquisición de nuevas variantes a nivel de la célula madre leucémica (*leukemic stem cells* –LSC–), que confieren una mayor capacidad proliferativa y una ventaja en la supervivencia celular en condiciones de estrés. Estas variantes se observan fundamentalmente en genes asociados de nuevo a la regulación epigenética (como IDH1/1) o a otras funciones celulares como el *splicing*, la transcripción (como *RUNX1*) o la señalización celular (como *NRAS*, *KRAS*, *NF1* o *FLT3*). Estudios recientes indican que la concurrencia de variantes, en las células blásticas y granulocitos, es un elemento característico de los SMD y LMA-MRC, apoyando el modelo de leucemogénesis basada en la progresión de la hematopoyesis clonal. Por el contrario, las LMA *de novo* se encuentran especialmente enriquecidas en variantes específicamente asociadas a LMA (como las proteínas de fusión) y que no se observan de un modo concurrente en blastos y granulocitos[8].

Se ha evidenciado que la adquisición de nuevas variantes a lo largo de la progresión/transformación está influenciada por fenómenos de complementariedad funcional, redundancia y letalidad sintética. La complementariedad se observa cuando las variantes ocurren en genes implicados en diferentes funciones biológicas. Por ejemplo, la aparición de variantes en 3 genes como *TET2*, implicado en la regulación epigenética; *SRSF2*, implicado en los mecanismos de *splicing*; y *RUNX1*, factor de transcripción esencial en la diferenciación hematopoyética. Por otro lado, se ha observado que la combinación de variantes en ciertos genes ocurre con una frecuencia significativamente menor que lo que cabría esperar por casualidad. Se ha postulado que esto podría ser secundario a fenómenos de redundancia funcional o letalidad sintética, de modo que la presencia de ambas variantes tendría un efecto neutral o negativo (por ejemplo, habitualmente no se observan 2 variantes en genes implicados en el *splicing* o la presencia concurrente de ASXL1 y DNMT3A es excepcional)[9].

Es importante tener en cuenta que este modelo de adquisición progresiva de nuevas variantes que caracteriza a las LMA-MRC implica que, en ocasiones, tras el tratamiento de una leucemia aguda, clones iniciales con una baja tasa de proliferación y que presentan una resistencia a los medicamentos puedan persistir. Estos primeros clones que exhiben las lesiones similares a CHIP pueden permanecer en silencio durante toda la vida del huésped o pueden ser clínicamente relevantes[10].

Finalmente, la presencia de variantes con un VAF bajo en pacientes en tratamiento quimioterápico tiene unas implicaciones distintas a la observada en el

contexto del envejecimiento. Así, la presencia de una CHIP en el momento del trasplante autólogo en pacientes tratados por linfoma se ha identificado en casi un 30% de los casos y se ha asociado a un mayor riesgo de desarrollar una hemopatía mieloide secundaria al tratamiento (14,1 *vs*. 4,3% para aquellos con y sin CHIP, respectivamente; p = 0,002) y a una menor supervivencia global (supervivencia global a 10 años: 30,4 *vs*. 60,9%, respectivamente; p < 0,001)[11].

Por tanto, estos estudios ponen de manifiesto que la progresión desde la CHIP hasta la LMA es un proceso caracterizado por la adquisición progresiva de cambios genéticos donde las combinaciones de las variantes, el orden de aparición y el contexto en el que ocurren determinan el fenotipo, el pronóstico y la respuesta a la terapia.

› Conclusión

La secuenciación masiva nos ha proporcionado un mapa genético de los SMD, firmas característicamente asociadas a la progresión de CHIP a SMD y de SMD a LMA secundaria, y la identificación de los procesos moleculares alterados en estas patologías.

La CHIP es una condición premaligna, común en los adultos mayores, asociada con un conjunto específico de variantes, más comúnmente en los genes *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *TP53* y *SF3B1*, lo que sugiere que estos genes son clave en el inicio de la enfermedad.

Por el contrario, las variantes en factores de transcripción y las vías de señalización ocurren fundamentalmente durante la progresión a SMD de alto riesgo y LMA secundaria. Firmas genéticas de cooperativismo y mutualismo excluyente determinan la progresión hacia la leucemia aguda secundaria.

› Bibliografía

1. Valent P, Akin C, Arock M, Bock C, George TI, Galli SJ, et al. Proposed Terminology and Classification of Pre-Malignant Neoplastic Conditions: A Consensus Proposal. EBioMedicine. 2017 Dec;26:17-24.
2. Jaiswal S1, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. N Engl J Med. 2014 Dec 25;371(26):2488-98.
3. Valent P, Kern W, Hoermann G, Milosevic Feenstra JD, Sotlar K, Pfeilstöcker M, et al. Clonal Hematopoiesis with Oncogenic Potential (CHOP): Separation from CHIP and Roads to AML. Int J Mol Sci. 2019 Feb 12;20(3).
4. Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos. Guía de aplicación clínica de la secuenciación masiva en síndromes mielodisplásicos y leucemia mielomonocítica crónica. 2014. Disponible en: https://www.sehh.es/images/stories/recursos/2017/12/21/GUIA_NGS.pdf.
5. Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. The genetics of myelodysplastic syndrome: From clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. Nat Rev Cancer. 2017 Jan;17(1):5-19.
6. Makishima H,, Yoshizato T, Yoshida K, Sekeres MA,, Radivoyevitch T, Suzuki H, et al. Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. Nat Genet. 2017 Feb;49(2):204-12.
7. Malcovati L,, Gallì A, Travaglino E, Ambaglio I, Rizzo E, Molteni E, et al. Clinical significance of somatic mutation in unexplained blood cytopenia. Blood. 2017 Jun 22;129(25):3371-8.
8. Yokoyama K, Shimizu E, Yokoyama N, Nakamura S, Kasajima R, Ogawa M, et al. Cell-lineage level–targeted sequencing to identify acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes. Blood Adv. 2018 Oct 9;2(19):2513-21.
9. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
10. Wong TN, Miller CA, Klco JM, Petti A, Demeter R, Helton NM, et al. Rapid expansion of preexisting nonleukemic hematopoietic clones frequently follows induction therapy for de novo AML. Blood. 2016 Feb 18;127(7):893-7.
11. Gibson CJ, Lindsley RC, Tchekmedyian V, Mar BG, Shi J, Jaiswal S, et al. Clonal Hematopoiesis Associated With Adverse Outcomes After Autologous Stem-Cell Transplantation for Lymphoma. J Clin Oncol. 2017 May 10;35(14):1598-605.

Implicaciones clínicas y seguimiento de los pacientes con hematopoyesis clonal

Blanca Xicoy Cirici
Servicio de Hematología Clínica, Institut Català d'Oncologia-Hospital Germans Trias i Pujol, Josep Carreras Leukemia Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona

Se define como hematopoyesis clonal (HC) a la expansión de células progenitoras hematopoyéticas en la médula ósea y la presencia de células sanguíneas con una mutación asociada a neoplasias hematológicas, en ausencia de blastos y, lo más frecuente, sin citopenias ni displasia. Es uno de los descubrimientos más importantes de los últimos años en la biología del envejecimiento, la hematología y la patología cardiovascular[1-7].

El clon portador de la mutación suele tener una frecuencia alélica de la variante (VAF) inferior al 10% y los genes más frecuentemente implicados son *DNMT3A*, *TET2* y *ASXL1*. Estos están relacionados con cambios epigenéticos o remodelamientos de la cromatina y, por ello, con la expresión de determinados genes. La HC es cada vez más frecuente conforme aumenta la edad, de manera que la prevalencia a los 70 y 80 años es de alrededor del 10 y el 20% de la población, respectivamente[1-7].

› Implicación clínica

Estas mutaciones tienen relevancia clínica por 2 razones: primero, confieren un riesgo 10 veces mayor y anual del 1% de desarrollar una hemopatía maligna, como un síndrome mielodisplásico (SMD), neoplasia mieloproliferativa (NMP), leucemia mieloide aguda (LMA) y, menos frecuentemente, hemopatías linfoides; y segundo, implica un riesgo aumentado de tener eventos cardiovasculares y de mortalidad por infarto de miocardio y accidente vascular cerebral, de forma que la tasa de muerte es 4 veces mayor en pacientes con HC respecto a los que no la tienen y, a nivel clínico, la presencia de HC puede tener igual relevancia que la que tiene el hábito tabáquico o la hipercolesterolemia[1-7].

Tres grandes estudios han investigado la relevancia clínica de la HC en humanos sin una enfermedad hematopoyética conocida, secuenciando el exoma/genoma en sangre periférica. La mayoría de los 32.290 pacientes estudiados tenían antecedentes patológicos de diabetes mellitus o enfermedad psiquiátrica, y 2.728 pacientes de tumores sólidos[1-3]. Se objetivó HC en menos del 1% de los pacientes menores de 40 años, pero entre las personas con edad entre 71 y 80 años la prevalencia fue del 9,5 y el 13,9%, y, en mayores de 80 años, el porcentaje aumentó al 16,4%. Los varones tenían 1,3 veces más de HC que las mujeres. La mayoría de las personas con una mutación asociada a HC no tenía citopenias, pero la media del volumen corpuscular medio (VCM) fue significativamente más elevada que en las que no tenían dicha mutación. Los genes más frecuentemente mutados, conocidos como DTA, eran aquellos que también son los más prevalentes en pacientes con LMA y SMD: *DNMT3A*, *TET2* y *ASXL1*, siendo DNMT3A el más frecuente (26-58%). El riesgo de desarrollar una hemopatía maligna fue de 11 a 13 veces mayor; sin embargo, el riesgo absoluto fue bajo, con una tasa anual del 0,5 al 1%. De los pacientes con HC que desarrollaron una hemopatía maligna, aproximadamente el 60% eran neoplasias mieloides (LMA, SMD, leucemia mielomonocítica crónica y NMP) y aproximadamente el 40% una neoplasia linfoide, como leucemia linfática crónica (LLC), mieloma múltiple (MM) o linfoma de células B. Curiosamente, la mortalidad general fue significativamente mayor en los pacientes que tenían HC y, en uno de los estudios, este hallazgo se debía a una mayor mortalidad por cáncer; otro estudio mostró significativamente un mayor riesgo de presentar eventos cardiovasculares (ECV) graves (enfermedad coronaria y accidente vascular cerebral). Los pacientes con una VAF más elevada tenían un mayor riesgo de desarrollar una hemopatía maligna y mayor mortalidad. Todo ello evidencia la relación causal entre la HC y estos eventos[1-7].

En el estudio *Health and Anemia Study*, realizado en 1.004 personas de edad superior a 60 años, la HC se asoció con una reducción de la supervivencia. Además, cambios precoces en los índices eritrocitarios (amplitud de distribución eritrocitaria –ADE– y VCM) eran predictivos de evolución a un SMD. Los análisis preliminares sugerían que la combinación de mutaciones y factores no mutacionales como la ADE y el VCM (tras excluir déficits vitamínicos) podría mejorar la capacidad de predecir el riesgo individual de desarrollar un SMD frente a considerar solo datos moleculares. En esta cohorte la citopenia fue común e inexplicada en un 27% de los casos y la detección de una mutación predecía el desarrollo de un SMD y peor supervivencia. Con todo ello, se suponía que el 8% de las citopenias en personas con edad superior a 65 años correspondería en realidad a la existencia de un SMD. El estudio también corroboraba que las mutaciones en *TET2* y *DNMT3A* eran predictivas del desarrollo de SMD y aumentaban el riesgo de presentar un ECV y una enfermedad reumatológica[8].

Pero la HC tiene lugar en diferentes contextos además del envejecimiento. En primer lugar, los pacientes en los que, tras el tratamiento por una neoplasia sólida (mama, pulmón o próstata), se detecta una HC tienen significativamente más riesgo de desarrollar un SMD o una LMA, y ello se debe con frecuencia a la presencia de la mutación en el gen *TP53 o PPM1D*; segundo, la HC en pacientes con aplasia medular puede ser debida a la presencia de mutaciones en los genes *PIGA*, *BCOR* o *BCORL1*, con un curso más indolente y una alta probabilidad de responder al tratamiento inmunodepresor, o bien ser secundaria a la presencia de mutaciones en los genes *DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2* o a una mutación asociada a LMA (por ejemplo, en el gen *RAS*) con un riesgo elevado de desarrollar un SMD o una LMA; en tercer lugar, tras finalizar una quimioterapia por una LMA pueden detectarse mutaciones en *DNMT3A*, *ASXL1* o *TET2*, pero ello no tiene por qué significar un riesgo de recaída de la leucemia, porque para ello deben adquirirse otras mutaciones con mayor potencial leucemogénico[4-6].

Muchas hemopatías malignas, como el MM y la LLC, tienen un estado precursor bien definido que precede al desarrollo de la hemopatía establecida. El MM está casi siempre precedido por una gammapatía monoclonal de significado incierto. Resultados preliminares de un estudio realizado en 629 pacientes con MM, con una mediana de edad de 58 años (extremos: 24-83) en el momento del trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) autólogo y con una mediana de seguimiento tras el TPH de 8 años (extremos: 0,1-14,5), evidenciaron HC en el 32% de los casos. Los genes más frecuentemente implicados fueron *DNMT3A*, *TET2*, *TP53*, *ASXL1* y *PPM1D*. La HC se asociaba a una peor supervivencia global y libre de progresión en los pacientes que no recibían tratamiento de mantenimiento con inmunomoduladores (IMiD) después del TPH autólogo; y en los pacientes con HC, el uso de IMiD tras el TPH autólogo eliminaba el efecto deletéreo de la HC hasta el punto de que el pronóstico era similar al de los pacientes sin ella[9]. Por otro lado, en la LLC se postula que la HC, la linfocitosis B monoclonal (LBM) y la LLC representarían la evolución de un clon desde la célula progenitora hematopoyética hasta la célula B madura[10]. Datos preliminares de un estudio de la Mayo Clinic y el National Cancer Institute, realizado en 571 individuos de 132 familias con LLC (incluyendo LLC, LBM y familiares no afectos), observaban una prevalencia de HC en la LLC, LBM y familiares no afectos del 17, el 12 y el 8%, respectivamente. De nuevo, las mutaciones más frecuentes fueron *DNMT3A*, *ASXL1* y *TET2*. Este estudio observó una asociación entre la presencia de HC y el riesgo de LLC comparado con los familiares no afectos, pero no con el riesgo de presentar una LBM[11].

Es un hecho demostrado que la HC aumenta el riesgo de ECV. Este aspecto ha sido estudiado con mayor profundidad en los SMD. La *Surveillance, Epidemiology, and End Results data base* (SEER) demostró recientemente que, a los 60 meses del diagnóstico, los pacientes con SMD de bajo riesgo tenían un mayor riesgo de muerte por ECV que por el propio SMD[12]. Y, en este sentido, un estudio realizado en 566 pacientes en el MD Anderson Cancer Center, en donde el 44% de los pacientes con SMD de bajo riesgo muere por causas cardiovasculares, describía que la HC se asociaba a la aparición de comorbilidades y, en concreto, que las mutaciones en *DNMT3A* y *JAK2* se asocian con mayor probabilidad de infarto de miocardio y eventos trombóticos, respectivamente. La incorporación de las mutaciones asociadas a HC y de escalas de comorbilidad, como el *Adult Comorbidity Evaluation 27* (ACE-27), al *Revised International Prognostic Scoring System* (IPSS-R) podría mejorar la estratificación pronóstica de los pacientes con SMD[13].

Pese a todo lo expuesto anteriormente, hay muchos aspectos por aclarar: primero, la correcta identifica-

ción de las mutaciones que son predictivas de desarrollo de aterosclerosis o de hemopatía maligna; segundo, la cantidad de HC necesaria para aumentar ese riesgo; tercero, los mecanismos que subyacen al desarrollo de ECV y a la evolución del clon con HC; cuarto, el enfoque clínico a plantear, porque puede primar prevenir o tratar los ECV, o bien reducir o eliminar el clon con HC, o ambas cosas; y, por último, cómo el profesional gestiona la información que debe transmitir a una persona o paciente con HC.

› Seguimiento clínico

Es probable que muchas personas con HC con cifras hemoperiféricas normales estén controladas a nivel de primaria por otras enfermedades o incluso por el cardiólogo si tienen ECV. Solo si presenta alteraciones en el hemograma va a ser remitida al hematólogo, que es quien, actualmente, puede sospechar e identificar la existencia de una HC.

Y el hematólogo deberá decidir a quién descartar la presencia de HC. De entrada, dados los recursos disponibles, parece razonable centrar la atención, por un lado, en los pacientes en quienes se identifica una HC incidentalmente como parte del estudio de una neoplasia o en un control tras haber sobrevivido a esta (especialmente si se detecta la mutación *TP53*) y, por otro lado, en las personas que tienen citopenias persistentes e inexplicadas tras un estudio exhaustivo[6]. En este segundo supuesto existe un riesgo relativamente alto de tener al menos una mutación asociada a HC y el valor predictivo positivo de tener una neoplasia mieloide subyacente tras hallar una mutación asociada a HC es de más del 80%, pero, en su ausencia, el diagnóstico de HC en estas personas permitirá evitar un falso diagnóstico de neoplasia mieloide y las consecuencias negativas derivadas de un tratamiento innecesario.

Otra cuestión es si se debe estudiar a la amplia población de personas con edad superior a 70 años. Hacer un cribado en la población general solo por la edad no sería rentable porque, aunque son las que tienen mayor riesgo de tener HC y ECV, el riesgo de presentar una neoplasia es muy bajo; también porque los métodos de secuenciación son caros y no están todavía estandarizados; y, lo más importante, porque no hay evidencia derivada de estudios prospectivos de que cualquier tipo de intervención encaminada a evitar las consecuencias de la HC sea beneficiosa; por ello, la única consecuencia clara de identificar hoy en día una HC en estas personas sería provocarles un nivel de ansiedad innecesario[14].

Y es también cuestionable si en un paciente concreto con ECV debemos descartar la presencia de HC o, a la inversa, si este mismo paciente tiene una neoplasia maligna, si debemos descartar la presencia de ECV. Probablemente no en el primer supuesto, por los mismos motivos que no lo haríamos en personas de edad avanzada, como se ha expuesto anteriormente; y probablemente sí en el segundo, porque puede ayudar a no aumentar la toxicidad de los tratamientos antineoplásicos y, posteriormente, a mejorar la calidad de vida de los supervivientes de una neoplasia.

Una vez identificada la HC en un paciente concreto, y dado que todavía no sabemos disminuir el ECV asociado a la HC, debería ser una prioridad minimizar cualquier otro factor de riesgo que pueda tener, como el tabaquismo, la diabetes mellitus de tipo 2, la hipercolesterolemia y/o la hipertensión arterial. De todos modos, está por establecer la estrategia óptima de cribado y de prevención de ECV. A falta de ello, se podrían considerar las recomendaciones de la *American Heart Association*, el *American College of Cardiology*, la *European Society of Cardiology* y otras organizaciones focalizadas en la prevención de ECV[6].

Otra medida a explorar sería intentar disminuir la inflamación en la pared vascular sanguínea; el ensayo clínico *CANTOS* de canakinumab (anti-IL-1β) *vs.* placebo, en pacientes con antecedente de infarto de miocardio y elevación persistente de la proteína C reactiva, evidenció menor recurrencia de ECV en los pacientes que recibían canakinumab; curiosamente, los pacientes que recibieron dosis más altas de este fármaco también tuvieron menos incidencia de cáncer de pulmón y menor mortalidad por este y por cáncer en general. De hecho, las muestras basales de la población del estudio *CANTOS* están siendo evaluadas para identificar la existencia de HC y para evidenciar si los pacientes con ella se beneficiaron más de esta intervención terapéutica[15]. Si fuera así, se podría disminuir el riesgo vascular asociado a la HC inhibiendo IL-1β, ya sea con canakinumab o con los nuevos inhibidores del inflamasoma como NLRP3[4-6,15-17].

También podríamos actuar directamente sobre el clon con HC y, en este sentido, estudios realizados con animales han observado que el ácido ascórbico, cofactor de la enzima TET, administrado a dosis altas

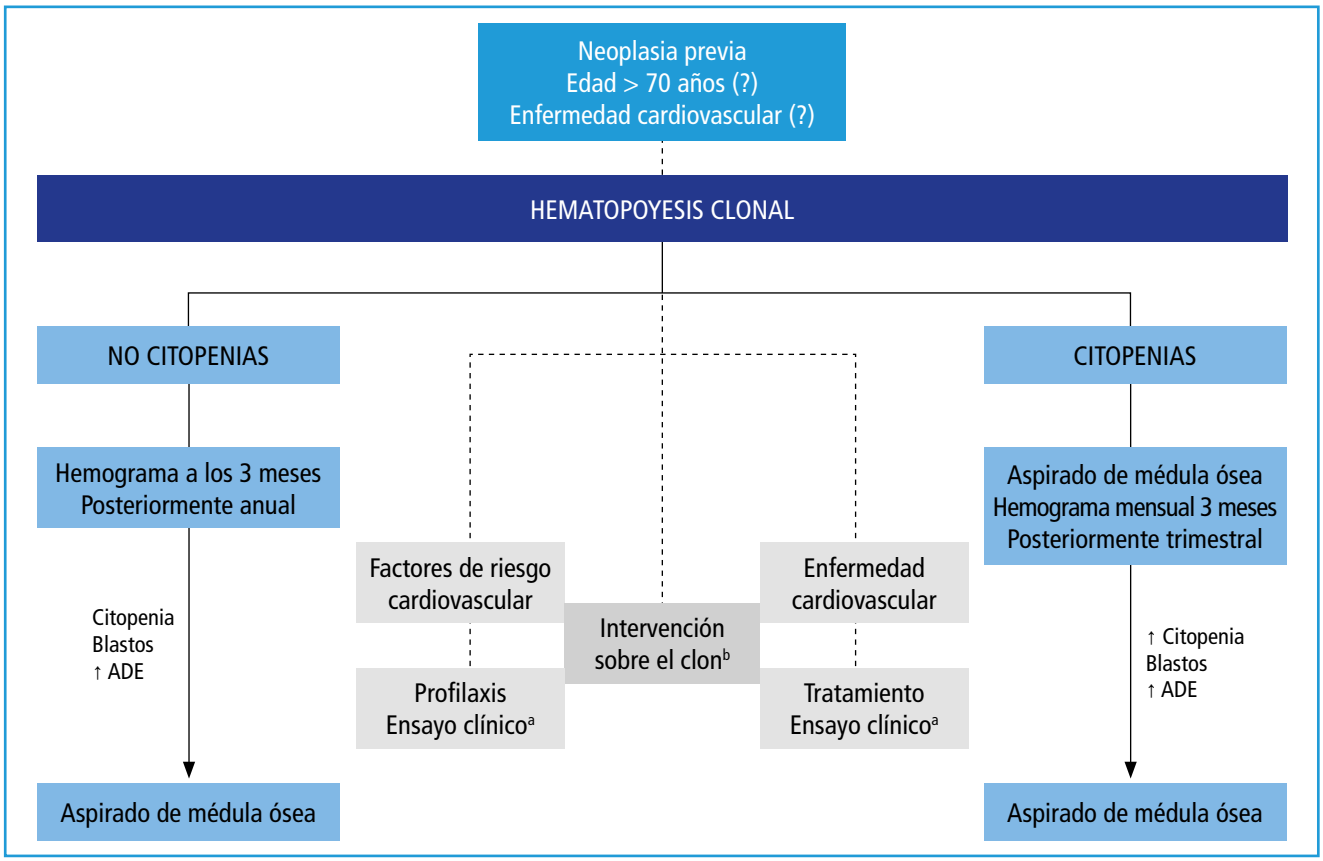


Figura 1. Propuesta de algoritmo de seguimiento e intervención de la hematopoyesis clonal. [a] Antiinflamatorios, hipolipemiantes, inmunomoduladores; [b] vitamina C, inmunomoduladores. ADE: amplitud de distribución eritrocitaria.

puede aumentar la actividad intracelular de TET y, por tanto, alterar la metilación del ADN y disminuir el crecimiento de las células leucémicas[18].

En cualquier caso, ya sea para disminuir la inflamación o intervenir a nivel epigenético y dada la alta prevalencia de HC en la población, nuestra estrategia terapéutica debería estar basada en un fármaco oral con un buen perfil de toxicidad.

Estas medidas deberían estar protocolizadas para realizar un buen seguimiento. La ADE puede ser un signo guía porque las personas con HC y una ADE de 14,5% o más tienen un mayor riesgo de muerte en comparación con aquellos que tienen una ADE superior a la normal sin HC[8,16]. Además, la ADE parece ser un factor de progresión a LMA en pacientes con HC[19]. Curiosamente, la inflamación asociada a HC en pacientes con ECV parece ir paralela a las alteraciones en la ADE[16].

A falta de protocolos de actuación, cuando la HC es un hallazgo incidental en pacientes con cifras hemoperiféricas normales, especialmente en pacientes con VAF elevada (superior al 10%) (mutaciones múltiples como, por ejemplo, mutación DTA asociada a otra en un gen de *splicing*) o mutaciones de alto riesgo (por ejemplo, *TP53*), sería razonable realizar un control 3 meses más tarde y posteriormente cada 12 meses, para identificar la aparición de cualquier citopenia o de blastos en sangre periférica. Y, cuando la HC se asocia a citopenias, estaría indicado realizar un estudio medular y un hemograma mensual hasta los 3 meses y posteriormente trimestral para detectar una intensificación de la citopenia y/o la aparición de blastos. Evidentemente, ante esta situación se repetiría el estudio medular para descartar la presencia de una hemopatía maligna[7,16] (Figura 1).

El futuro de este campo nos plantea muchos retos: primero, deberíamos determinar el perfil genético de forma más económica y estandarizada, porque hoy en día estamos analizando la presencia de HC con los mismos paneles que usamos para el diagnósti-

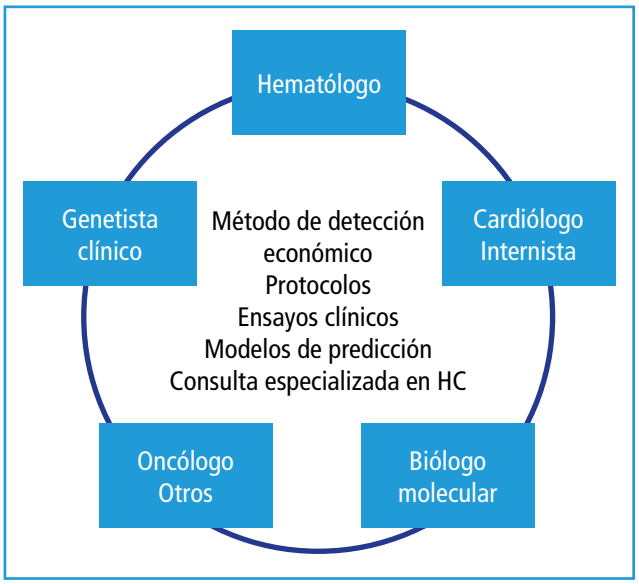


Figura 2. Enfoque multidisciplinar de la hematopoyesis clonal (HC).

co de neoplasias y solo desarrollando métodos más económicos podremos aplicarlos a grandes poblaciones; segundo, buscaremos la relación que la HC tiene con enfermedades diferentes de la aterosclerótica, dado el papel que juega en la inflamación y la influencia que tiene en el desarrollo y el pronóstico de muchas condiciones diferentes, como enfermedades reumatológicas o degenerativas (por ejemplo, la demencia de tipo Alzheimer), e incrementaremos el uso de fármacos inmunomoduladores en el tratamiento del cáncer; tercero, deben desarrollarse ensayos clínicos para el tratamiento y la prevención de la ECV, quizá con agentes antiinflamatorios o intensificando el tratamiento hipolipemiante de las personas con HC con alto riesgo de tener complicaciones derivadas de la misma. De hecho, están ya en fase de reclutamiento 2 ensayos clínicos: el primero (*ARCH-001*) en pacientes diagnosticados de cáncer con edad igual o superior a 60 años antes y después de recibir tratamiento con quimioterapia/radioterapia; a los pacientes con HC se les realiza analítica anual y son remitidos a cardiología para seguimiento; el segundo, *Aging, Geriatric Syndromes and Clonal Hematopoiesis*, incluye pacientes con edad igual o mayor a 50 años e incorpora una amplia gama de variables clínicas asociadas con el envejecimiento para determinar si están asociadas con el estado mutacional independiente de la edad cronológica. Por último, deberíamos profundizar en las características genéticas, epigenéticas o transcripcionales en pacientes con HC con alto riesgo de progresión a una hemopatía maligna, como aquellos en las que esta ha aparecido tras tratamiento citotóxico, porque en ellos estaría justificado un enfoque general más agresivo. Estudios recientes con técnicas de secuenciación de nueva generación han identificado individuos con HC con alto riesgo de desarrollar hemopatías malignas basándose en modelos de predicción genética y clínica que tienen en cuenta variables como la edad, el sexo y la VAF[16,19]. Serán necesarios modelos similares que incorporen los factores de riesgo de ECV tradicionales para identificar pacientes con riesgo de desarrollar una ECV.

Hemos entrado en la era genómica y cada vez más pacientes tendrán datos moleculares paralelos a sus datos clínicos, ambos modificables con el tiempo. En este escenario entran en juego aspectos éticos y legales no del todo cubiertos hasta ahora y, por ello, es importante la colaboración de, como mínimo, genetistas, hematólogos y cardiólogos, para que el profesional se sienta seguro, por un lado, en la integración de la información clínica y genética, y, por otro lado, en la comunicación de esta (el qué y el cómo) al paciente que, por cierto, es libre de querer conocer o no.

En definitiva, será necesario un enfoque multidisciplinar y de guías de consenso/protocolos de actuación integrados (Figura 2). Es posible que proliferen consultas especializadas en HC, que realicemos estudios para evaluar el efecto de la HC sobre la biología/patología de la ECV y otras enfermedades donde la inflamación juega un papel importante y estudios que evalúen tratamientos para prevenir la enfermedad cardiaca, disminuir la inflamación y actuar sobre los clones responsables de la HC, con antiinflamatorios e inmunoterapias selectivas. Si pudiéramos intervenir de alguna forma en reducir la inflamación o disminuir la población clonal, podríamos prevenir todas las complicaciones asociadas a la HC.

› Bibliografía

1. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. N Engl J Med. 2014;371:2488-98.
2. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. N Engl J Med. 2014;371:2477-87.

3. Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. Nat Med. 2014;20:1472-8.
4. Steensma DP. Clinical consequences of clonal hematopoiesis of indeterminate potential. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2018 Nov 30;2018(1):264-9.
5. Steensma DP. Clinical consequences of clonal hematopoiesis of indeterminate potential. Blood Adv. 2018;2:3404-10.
6. Steensma DP. Clinical Implications of Clonal Hematopoiesis. Mayo Clin Proc. 2018;93:1122-30.
7. Heuser M, Thol F, Ganser A. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential. Dtsch Arztebl Int. 2016;113:317-22.
8. Rossi M, Meggendorfer M, Zampini M, Tettamanti M, Riva E, Saba E, et al. Clinical Relevance of Clonal Hematopoiesis in the Oldest-Old Population: Analysis of the "Health and Anemia" Study. Blood. 2018;132:750.
9. Mouhieddine TH, Park J, Redd RA, Gibson CJ, Manier S, Nassar AH, et al. The Role of Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential (CHIP) in Multiple Myeloma: Immunomodulator Maintenance Post Autologous Stem Cell Transplant (ASCT) Predicts Better Outcome. Blood. 2018;132:749.
10. Agathangelidis A, Ljungström V, Scarfò L, Fazi C, Gounari M, Pandzic T, et al. Highly similar genomic landscapes in monoclonal B-cell lymphocytosis and ultrastable chronic lymphocytic leukemia with low frequency of driver mutations. Haematologica. 2018;103:865-73.
11. Boddicker NJ, O'Brien DR, Braggio E, Achenbach SJ, Chaffee KG, Norman AD, et al. Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential (CHIP) and Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Driver Genes: Risk of CLL and Monoclonal B-Cell Lymphocytosis (MBL). Blood. 2018;132:3116.
12. Brunner AM, Blonquist TM, Hobbs GS, Amrein PC, Neuberg DS, Steensma DP, et al. Risk and timing of cardiovascular death among patients with myelodysplastic syndromes. Blood Adv. 2017 Oct 18;1(23):2032-40.
13. Naqvi K, Sasaki K, Montalban-Bravo G, Alfonso-Pierola A, Yilmaz M, Short N, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential-associated mutations and risk of comorbidities in patients with myelodysplastic syndrome. Cancer. 2019 Mar 12. [Epub ahead of print].
14. Gibson CJ, Steensma DP. New Insights from Studies of Clonal Hematopoiesis. Clin Cancer Res. 2018;24:4633-42.
15. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. CANTOS Trial Group. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. N Engl J Med. 2017;377:1119-31.
16. Calvillo-Argüelles O, Jaiswal S, Shlush LI, Moslehi JJ, Schimmer A, Barac A, et al. Connections Between Clonal Hematopoiesis, Cardiovascular Disease, and Cancer: a Review. JAMA Cardiol. 2019 Apr 1;4(4):380-7.
17. Ridker PM, MacFadyen JG, Thuren T, Everett BM, Libby P, Glynn RJ; CANTOS Trial Group. Effect of nterleukin-1β inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet. 2017;390(10105):1833-42.
18. Cimmino L, Dolgalev I, Wang Y, Yoshimi A, Martin GH, Wang J, et al. Restoration of TET2 function blocks aberrant self-renewal and leukemia progression. Cell. 2017 Sep 7;170(6):1079-1095.e20.
19. Abelson S, Collord G, Ng SWK, Weissbrod O, Mendelson Cohen N, Niemeyer E, et al. Prediction of acutemyeloid leukaemia risk in healthy individuals. Nature. 2018;559:400-

TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS Y TERAPIA CELULAR

Coordinadoras: **Dra. Lucía López Corral.** Hospital Clínico Universitario de Salamanca
Dra. Carmen Martínez Muñoz. Hospital Clínic, Barcelona

El éxito del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) depende de múltiples factores tanto pretrasplante como postrasplante. En este simposio se discutirá acerca de dos factores clave, como son la selección del donante de progenitores hematopoyéticos más óptimo y la enfermedad del injerto contra el receptor (EICR), complicación que continúa siendo hoy en día una causa de elevada morbimortalidad postrasplante. El primer ponente de esta sesión (**Dr. Ildefonso Espigado**, jefe de Hematología Clínica del Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla) realizará una actualización sobre l**os mitos y realidades de la selección del donante**. En ella mostrará, basándose en los estudios y documentos de consenso disponibles, cómo la selección de donantes debería entenderse como una situación de medicina altamente personalizada e individualizada según la situación clínica del paciente, la situación de la enfermedad y las opciones de donantes disponibles. Un hermano HLA idéntico o, en su defecto, un donante no emparentado HLA 8/8 compatible continúan siendo las opciones preferibles para la mayor parte de los pacientes. El uso de sangre de cordón umbilical puede tener preferencia para determinados pacientes pediátricos y minorías étnicas, mientras que la elección entre un donante no emparentado HLA 7/8 o un donante emparentado haploidéntico debe individualizarse y está actualmente muy ligada a la práctica clínica de cada centro. Las diversas opciones de donante permiten que en la actualidad virtualmente todo paciente candidato a alo-TPH disponga de uno y, a menudo, de varios donantes. En este caso, tras la compatibilidad HLA, la edad del donante y el estatus serológico para citomegalovirus (CMV) son las características más relevantes a la hora de seleccionar el donante más adecuado. La prontitud del inicio de búsqueda de donante alternativo en caso de no disponibilidad de hermano HLA idéntico es un aspecto de especial relevancia. En la ponencia se analizarán además aspectos aún controvertidos y que se encuentran en investigación, como son: el rol de las disparidades permisivas en DPB1, el lugar que debe ocupar el trasplante haploidéntico en el algoritmo de selección de donante alternativo o el impacto de la fuente de progenitores en los diferentes tipos de donantes.

La siguiente ponente es la **Dra. Mary E. Flowers**, directora del programa de seguimiento a largo plazo de pacientes trasplantados del Fred Hutchinson Cancer Research Center (Seattle, Washington, USA). En su ponencia, la experta realizará la revisión de los criterios de los National Institutes of Health (NIH) para el **diagnóstico, la clasificación y la valoración de la respuesta de la EICR crónica (EICRc)**, centrándose en las **limitaciones** que en la **práctica clínica** se encuentran los médicos que tratan con este tipo de paciente. La EICRc es la complicación tardía más frecuente del alo-TPH. Se trata de una enfermedad multisistémica que consta de un abanico muy amplio de manifestaciones clínicas que remedan a las propias de las enfermedades autoinmunes. Tanto por la EICRc como por los tratamientos inmunosupresores prolongados, los pacientes presentan una inmunodeficiencia persistente e infecciones recurrentes, junto con un deterioro con frecuencia muy marcado de la calidad de vida. Un diagnóstico precoz y certero, junto con una correcta clasificación, son fundamentales para el correcto abordaje terapéutico. Asimismo, es fundamental realizar un seguimiento estrecho del paciente por un equipo multidisciplinar que permita evaluar de forma óptima la respuesta al tratamiento y el control de los efectos secundarios del mismo. A pesar de que ajustarse a los criterios de los NIH es fundamental para poder obtener datos

de calidad que nutran la evidencia científica, son numerosas las limitaciones de los mismos en nuestra práctica clínica. La Dra. Flowers abordará, apoyándose en casos clínicos, las controversias y desafíos más frecuentes, y proporcionará herramientas y consejos para abordar estos retos: el diagnóstico diferencial de la EICRc con la EICR aguda (EICRa) y otras entidades, la identificación del síndrome de solapamiento como subcategoría de la EICRc, la importancia de atribuir correctamente las diferentes alteraciones en órganos a la EICRc y el reconocimiento del daño irreversible para evitar tratamientos innecesarios.

El mayor conocimiento de la fisiopatología de la EICR ha permitido el conocimiento de **nuevas dianas terapéuticas** y, por tanto, el desarrollo de estrategias terapéuticas prometedoras. El último conferenciante, el **Dr. Pere Barba** (Hospital Universitario Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona), realizará una actualización de las novedades en este campo, incluyendo la revisión tanto de las diferentes estrategias de manipulación del producto de aféresis (selección de células CD34+, depleción de células CD45RA…) como el papel del tratamiento de la EICR con células mesenquimales, ruxolitinib o ibrutinib, entre otros.

Para finalizar el simposio, se presentará la mejor comunicación oral del área del trasplante hematopoyético.

Selección de donantes para alotrasplante hematopoyético

Ildefonso Espigado
Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla

› Introducción

Entre los muchos factores que influyen en el resultado del trasplante hematopoyético los más importantes son la naturaleza y la situación de respuesta de la enfermedad basal, la situación clínica del paciente y las características de las células hematopoyéticas del injerto. Las características de las células del injerto dependen del donante seleccionado y el factor más influyente en dicha selección es el grado de histocompatibilidad entre donante y receptor.

Aunque la mayor parte de la evidencia científica sobre la selección de donantes procede de estudios no aleatorizados, en su mayoría retrospectivos, hay acuerdo bien fundamentado en que el mejor donante es un hermano HLA idéntico. Pero menos de un tercio de los pacientes disponen de este tipo de donante. La pregunta de en qué situaciones un paciente que no dispone de un hermano HLA idéntico como donante debe recibir un alotrasplante de donante alternativo está por contestar y debería ser individualizada, pero en la mayoría de los casos la práctica clínica es realizar un trasplante de un donante alternativo en función del riesgo de la enfermedad basal. La selección de donantes alternativos se basa en la práctica en elegir entre un donante no emparentado (DNE), 1 o 2 unidades de sangre de cordón umbilical (SCU) y un donante emparentado haploidéntico. Las recomendaciones actuales para seleccionar donantes alternativos de las guías de práctica clínica del National Marrow Donor Program/Center for International Blood and Marrow Transplant Research (NMDP/CIBMTR), la European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) y otras instituciones científicas se basan en considerar la supervivencia global como el resultado clínico de interés primario, a pesar de que otras medidas de resultados como GRFS (supervivencia sin recaída ni enfermedad injerto contra receptor –EICR–) y resultados reportados por los pacientes (por ejemplo, calidad de vida) proporcionan información de gran valor[1]. A continuación, se revisa la evidencia actual para la selección de donantes óptimos y de donantes alternativos.

› Compatibilidad HLA

Los antígenos leucocitarios humanos (HLA) son codificados por un grupo de genes del cromosoma 6 llamado complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC). El sistema HLA es la región genética más polimórfica conocida en el genoma humano. Un grupo de alelos de genes del HLA, llamado haplotipo, es heredado de cada progenitor. Por tanto, la probabilidad de que un individuo herede los mismos haplotipos que un hermano es del 25%. Un hermano HLA-idéntico es considerado el donante óptimo. La compatibilidad HLA entre donante y receptor se define mediante tipado a nivel alélico (alta resolución) de 10 *locus*: HLA-A, HLA-B, HLA-Cw (clase I) HLA-DR y HLA-DQ (clase II), aunque cada vez hay más evidencia de la relevancia de HLA-DPB1 (clase II)[1]. El nivel de tipado alélico discrimina entre genes que codifican proteínas de superficie celular que difieren en la secuencia de aminoácidos del dominio de reconocimiento antigénico, que es la porción "activa" de la molécula HLA que se une a los péptidos antigénicos e interacciona con los receptores celulares de los linfocitos T y *natural killer* (NK).

› Hermanos HLA idénticos

Menos de un tercio de los pacientes dispone de un hermano donante HLA-compatible efectivo. La disponibilidad de un hermano gemelo es poco frecuente.

› Donantes no emparentados HLA-idénticos

› *Características HLA*[2]

La probabilidad de encontrar un DNE compatible (8/8 o 10/10) varía entre el 16 y el 75% según el origen étnico del paciente. La probabilidad más baja la tienen los descendientes de africanos y la más alta los descendientes de europeos. Aunque ningún estudio prospectivo aleatorizado ha comparado los resultados de distintos tipos de donantes, un estudio prospectivo[3] y varios análisis retrospectivos indican que los resultados del trasplante de hermano HLA-idéntico y de DNE compatible (8/8 o 10/10) son comparables en términos de supervivencia, aunque con mayor incidencia de EICR severa en los DNE. Por este motivo, un DNE con identidad 8/8 para el HLA se considera el donante alternativo ideal.

La disparidad en uno cualquiera de los alelos HLA-A, -B, -C o -DRB1 (identidad 7/8) se asocia con peor supervivencia por incremento de mortalidad relacionada con el trasplante (MRT), con mayor impacto en la supervivencia cuanto más precoz es el estadio de la enfermedad. Sin embargo, algunas disparidades en DQB1 no tienen efecto negativo en supervivencia (son *permisivas*). Por otra parte, la mayoría de los trasplantes realizados en las últimas décadas no tenían en cuenta la compatibilidad en DPB1, lo que ha permitido observar retrospectivamente que las disparidades no permisivas en DPB1 también se asocian a peores resultados comparadas con las permisivas o las identidades completas (12/12)[4]. La posible asociación con reducción de la recidiva entre disparidades permisivas en DPB1 está siendo investigada (Tabla 1).

› *Características distintas al HLA*[5]

Tras la compatibilidad HLA, la **edad del donante** es la característica más relevante para el pronóstico del trasplante. Esto ha determinado que los DNE seleccionados con menos de 30 años hayan pasado del 36% (periodo 1988-2006) al 51% (periodo 1999-2011) y al 69% (periodo 2012-2014). Surge la pregunta no contestada por ahora de si sería mejor un DNE joven compatible HLA-8/8 o un hermano HLA compatible añoso. También el **estatus serológico para citomegalovirus (CMV)** tiene impacto en la supervivencia, siendo los mejores resultados en pacientes seronegativos que reciben un injerto seronegativo (combinación infrecuente en la práctica). El impacto de la disparidad de **sexo** es más controvertido (probablemente por cómo se ha definido en los distintos estudios). Para receptores varones, una donante mujer que ha tenido embarazos se ha asociado a peores resultados y en la práctica se evita si es posible. El impacto de la **disparidad ABO** es modesto y algunos estudios sugieren que ha descendido en los últimos años en probable relación con la disminución del uso de médula ósea (MO) como fuente. Las características distintas al HLA también se usan para elegir entre distintos hermanos

Tabla 1. Guías de práctica clínica para la selección de donante no emparentado (DNE)

	Varios DNE compatibles en HLA-A, -B, -C, -DRB1 (8/8)	Donante HLA 8/8 no disponible y varios donantes HLA-7/8 disponibles
1. Resolución del tipado	Alta resolución	Alta resolución Seleccionar el *mismatch* HLA-C*03:03 *vs.* C*03:04 si está presente No hay otras preferencias
2. Edad del donante	Seleccionar el más joven	Seleccionar el más joven
3. Disparidad permisiva en HLA-DPB1	Seleccionar una disparidad permisiva si es posible	Seleccionar una disparidad permisiva si es posible
4. Disparidad HLA-DRB3/4/5 y -DQB1	Minimizar las disparidades si es posible	Minimizar las disparidades si es posible
5. Vector del *mismatch*	No aplica	Seleccionar un donante con un solo alelo incompatible en el *locus* homocigoto del paciente (HLA-A/B/C/DRB1) si es aplicable (dirección rechazo)
6. Receptor con anticuerpos específicos contra el donante	Evitar *mismatches* en alotipos blanco de los anticuerpos, incluyendo DQA1 y DPA1	Evitar *mismatches* en alotipos blanco de los anticuerpos, incluyendo DQA1 y DPA1
7. La práctica de distintos centros puede diferir en consideraciones adicionales usadas en la selección entre múltiples donantes que sean equivalentes para las características anteriores		

Modificada de Dehn J, *et al.* Blood. 2019[2]

HLA idénticos, cuando es el caso. El peso del donante puede ser relevante para la obtención de celularidad adecuada de MO.

› Timing

Durante la búsqueda y la selección del injerto donante es muy importante no retrasar la realización del trasplante, en especial en determinadas situaciones clínicas (como en enfermedades malignas con alto riesgo de recaída), por lo que la búsqueda del donante más adecuado debe iniciarse en el momento en el que se establece o sospecha la indicación de trasplante, lo que para muchas enfermedades es al diagnóstico y, para otras muchas, después de la primera recidiva[2]. Por el mismo motivo, no debe prolongarse la búsqueda de DNE cuando por el HLA del paciente la probabilidad de que se encuentre es baja. En estos casos, debe considerarse con prontitud la opción de un donante alternativo[2].

› Donantes alternativos

› *Donantes no emparentados con disparidad en HLA*

› *Impacto de la disparidad (*mismatch*) HLA*[6]

El impacto inmunológico y clínico de las disparidades en el HLA está determinado por 3 factores fundamentales: 1) el efecto de la disparidad en la estructura física y química de la molécula de HLA y su péptido de unión; 2) la dirección de la disparidad (EICR, rechazo o bidireccional); y 3) el nivel de la expresión de la molécula HLA en la superficie celular. Algunos *mismatches* producen diferencias tan sutiles entre las proteínas generadas por los correspondientes alelos que no parecen resultar en alorreconocimiento con consecuencias clínicas. Este es el caso de la disparidad HLA-C*03:03 *vs.* HLA-C*03:04, la disparidad más frecuente entre individuos de origen europeo. En un estudio retrospectivo, parejas de donante/receptor con disparidades HLA-C*03:03/03:04 no tuvieron diferencias de mortalidad, supervivencia libre de enfermedad ni EICR aguda de grados 3-4 respecto a las parejas 8/8. De manera similar, se ha desarrollado un modelo basado en similitudes en las secuencias aminoacídicas que identifica 3 grupos de epítopos celulares T de DPB1 que difieren en capacidad inmunogénica, lo que se traduce en que distintos *mismatches* en DPB1 sean de alto o bajo riesgo (no permisivos o permisivos). Cuando donante o receptor expresan un solo alelo HLA en un *locus* (por ejemplo, por homocigocia), la disparidad es unidireccional. Si el receptor es el homocigoto, la reacción será en dirección rechazo para ese alelo. Si el homocigoto es el donante, la reacción será en dirección injerto-contra-receptor. Si no hay homocigocia o ambos son homocigotos pero dispares, para ese alelo la disparidad es bidireccional. Un estudio retrospectivo no encontró diferencias en supervivencia global entre disparidades 7/8 unidireccionales *vs.* bidireccionales, aunque cualquiera de ellas sí comportó menor supervivencia comparadas con parejas 8/8.

Los distintos *loci* del HLA varían en su nivel de expresión sobre la superficie celular y estas diferencias pueden afectar el alorreconocimiento e impactar en los resultados del trasplante. Sin embargo, se necesita más investigación en este tema antes de que pueda ser usado en la práctica para la selección de donantes.

› *Impacto de la disponibilidad del donante*

La tasa de disponibilidad real del donante es variable entre los distintos registros. En algunos países es inferior al 50%. Aspectos relacionados con la salud del donante también pueden condicionar su disponibilidad.

› *Alorreactividad de las células* natural killer

La selección de un DNE para maximizar la activación de las células NK para potenciar el efecto antileucémico y mejorar la supervivencia no se soporta actualmente con los datos disponibles, por lo que la identidad HLA sigue siendo la prioridad. Continúa siendo un área de intensa investigación.

› *Sensibilización del paciente con anticuerpos anti-HLA*[7]

Aproximadamente un tercio de los adultos con enfermedades hematológicas malignas presentan anticuerpos circulantes contra antígenos del HLA. La incidencia es de 2 a 3 veces superior en mujeres y aumenta con el número de embarazos. Varios estudios han relacionado los anticuerpos anti-HLA específicos con fallo de implante en DNE y trasplantes haploidén-

Tabla 2. Número de células según la fuente celular

	Volumen colectado	Contenido de CD34+	Contenido de CD3+	Objetivo de dosis celular
Médula ósea	10-20 mL/kg	2-3 × 10^6/kg*	25 × 10^6/kg*	> 2 × 10^8 CNT/kg*
Sangre periférica	150-400 mL	8 × 10^6/kg*	250 × 10^6/kg*	5-10 × 10^6 CD34+/kg*
Sangre de cordón umbilical	80-160 mL	0,2 × 10^6/kg*	2,5 × 10^6/kg*	> 3 × 10^7 CNT/kg*

* Por kg de peso corporal del receptor
CNT: células nucleadas totales

ticos, aunque los datos no son tan claros con la SCU. Por tanto, a los pacientes con anticuerpos contra el HLA y un injerto *mismatched* hay que estudiarles la especificidad del anticuerpo antes del trasplante y elegir un donante cuyas disparidades no sean en el *loci* contra el que van dirigidos los anticuerpos específicos. Si no hay disponible un donante con esas características, un tratamiento de desensibilización para reducir los niveles del anticuerpo puede mejorar las posibilidades de prendimiento.

› *Sangre de cordón umbilical*[2]

› *Criterios no-HLA: calidad de la unidad y dosis celular*

En el trasplante con SCU los factores no HLA son tan importantes como la compatibilidad HLA. La SCU tiene la ventaja de la rápida disponibilidad y la menor exigencia en la compatibilidad HLA comparada con la MO o la sangre periférica (SP), lo que ha extendido la posibilidad del trasplante a minorías étnicas. La selección de una unidad de SCU se basa en la calidad de la unidad, la dosis celular criopreservada y la compatibilidad HLA. La calidad de la unidad depende de las prácticas en el banco de sangre y/o el centro de hemotransfusión, y está muy asociada a la viabilidad y la recuperación celular CD34+ posdescongelación. Un estudio colaborativo encontró que dosis totales de células nucleadas de al menos 3,0 × 10^7/kg del receptor se asociaron a un buen resultado en el trasplante[8]. Dosis superiores no mejoraron la recuperación hematopoyética ni la supervivencia, pero dosis inferiores incrementaron la mortalidad. Si no se dispone de una unidad de SCU con dosis celular adecuada, la práctica estándar es usar 2 unidades de SCU, cada una de las cuales debe contener un mínimo de 1,5 × 10^7/kg de células nucleadas (Tabla 2). El contenido de células CD34+ es posiblemente un mejor predictor de la potencia de la unidad y actualmente es práctica estándar para la selección de unidades de SCU. Se recomienda una dosis precongelación de 1,5 × 10^5/kg para una única unidad y de 1,0 × 10^5/kg para cada unidad en trasplantes con 2 unidades (Tabla 2). Cuando las dosis de células nucleadas totales y CD34+ no son concordantes, es muy posible que haya un error en el reporte de la unidad y debe aclararse antes de que dicha unidad sea seleccionada.

› *Requerimientos de compatibilidad HLA de las unidades de sangre de cordón umbilical*

Aunque históricamente se ha aceptado menor grado de compatibilidad, actualmente se considera necesario que la unidad esté tipada en alta resolución a nivel HLA-A, -B, -C y -DRB1. Las disparidades en 2 o más *locus* se han asociado a peor recuperación de neutrófilos y mayor fallo del implante y mortalidad. En el contexto del trasplante con 2 unidades, se deben emplear los mismos criterios de compatibilidad HLA. No hay datos que apoyen que sea necesario considerar la compatibilidad entre las 2 unidades empleadas. Por tanto, la selección de unidades de SCU se basa en los siguientes principios: 1) calidad adecuada de la unidad; 2) dosis de células nucleadas y CD34+ adecuadas (Tabla 2); y 3) compatibilidad HLA óptima a nivel de HLA-A, -B, -C y DRB1 por alta resolución. No hay datos sobre cómo balancear la decisión entre la dosis de CD34+ y la compatibilidad HLA.

› *Estrategia de búsqueda de donante*

Ya que la mayoría de los donantes o las unidades de SCU de los registros internacionales no están completamente tipados por alta resolución, a los posibles donantes o unidades encontrados se les debe realizar un tipado adicional antes de poder ser seleccionados. La probabilidad de encontrar un donante efecti-

vo para cada paciente concreto depende de factores como que los alelos y haplotipos del paciente sean o no comunes, la etnia del paciente y los donantes, la urgencia clínica, la disponibilidad efectiva de los posibles donantes y la confirmación por alta resolución del tipado[2]. Por tanto, se debe hacer una primera selección de varios posibles donantes para seleccionar finalmente uno. Es importante establecer un tiempo máximo de búsqueda razonable en función de consideraciones clínicas para cada paciente individual, más allá del cual un donante alternativo puede ser una mejor opción que prolongar fútilmente la búsqueda. Existen herramientas informáticas (HapLogic®) para calcular la probabilidad de encontrar un donante efectivo en función de los haplotipos del paciente. Según datos del Registro de MO (REDMO), en España un 73% de las búsquedas iniciadas encuentran un DNE 8/8 o 7/8 antes de 6 meses y el tiempo medio de búsqueda es de 41 días.

› *Donantes emparentados haploidénticos*

Los avances en las estrategias de trasplante (uso de ATG pretrasplante, ciclofosfamida postrasplante y depleción alfa-beta del inóculo) han mejorado los resultados del trasplante haploidéntico. Su utilización ha aumentado rápidamente en los últimos años en función de estudios retrospectivos que sugieren que los resultados pudieran no ser inferiores a los de los DNE o de SCU. A favor del haplotrasplante también se esgrimen argumentos, no confirmados, de menor coste y mayor rapidez en la disponibilidad.

Estos estudios realizan comparaciones retrospectivas no aleatorizadas y tienen importantes inconvenientes metodológicos que impiden obtener conclusiones concluyentes. El mayor sesgo de los estudios retrospectivos es que se desconocen las motivaciones para la elección del tratamiento, por lo que es muy probable que la elección se relacione con características del paciente o su situación clínica en el momento de la decisión. Por ello, tanto si se encuentran diferencias como si no se encuentran, entre cohortes que recibieron distintos tratamientos o procedimientos, no es posible conocer si dicho resultado se debe realmente al efecto de los tratamientos que se comparan o a las características de los pacientes de cada cohorte[9]. Los haplotrasplantes son más recientes que los trasplantes de DNE y la experiencia científica acumulada con ellos mucho menor. Y aunque pueden permitir disponer de un donante en pacientes que no tengan un donante hermano o no emparentado HLA adecuado (fundamentalmente en el caso de minorías étnicas) sus resultados a corto y largo plazo son todavía inciertos. Se esperan con expectación los resultados de estudios comparativos prospectivos en marcha.

› Selección de donante alternativo

› *Indicación de alotrasplante de donante alternativo*

No está contestada la importante cuestión de *quién debe recibir un trasplante de donante alternativo*. Juzgar si un paciente necesita un trasplante de donante alternativo depende de la posibilidad de predecir con certeza cómo una persona (no una cohorte) cursará sin el trasplante. Por ejemplo, se acepta que una persona con leucemia mieloblástica aguda (LMA) que recae necesita un trasplante alogénico. Sin embargo, varios sistemas pronósticos identifican con seguridad una cohorte con una probabilidad del 50% de supervivencia libre de enfermedad (SLE) a 5 años[10]. Cuando se toman las variables usadas para desarrollar sistemas pronósticos en LMA y se llevan a curvas ROC (*receiver-operator characteristics curve*) que definen la precisión de un test para predecir el resultado en una persona individual (*vs.* una cohorte), resulta que estos sistemas pronósticos son ligeramente superiores a tirar una moneda al aire[10]. Es improbable que los análisis genéticos y de enfermedad mínima residual mejoren estos cálculos. La mayor utilidad de la opinión de expertos es la toma de decisiones en casos individuales complejos[10].

› *Elección de donante alternativo*

Ante la ausencia de datos comparativos definitivos no es posible recomendar con fundamento una u otra opción de donante alternativo, aunque en los últimos años el número de trasplantes haploidénticos haya crecido de manera exponencial. Se debe considerar, primero, si la indicación de alotrasplante se mantiene con un donante alternativo para el paciente concreto (riesgo de la enfermedad, urgencia del trasplante, disponibilidad de donante y consideraciones de práctica del centro).

Cada donante alternativo tiene ventajas y desventajas (Tabla 3). Para que su comparación fuera útil res-

Tabla 3. Comparación teórica de riesgos y beneficios de los donantes alternativos

	DNE	SCU	HLA-haploidéntico
Disponibilidad	++	++	++++
Fallo de injerto	+	++++	++
EICR	++	+	++++
Infección	++	++++	+++
Recidiva	++	++++	++
SLE	+++	++	++

Modificada de Gale & Eapen[8]
DNE: donante no emparentado; EICR: enfermedad injerto contra receptor; SCU: sangre de cordón umbilical; SLE: supervivencia libre de enfermedad

pecto a la toma de decisiones clínicas en pacientes concretos, los estudios que los compararan deberían categorizarse prospectivamente por factores críticos tales como la enfermedad, los estadios y la edad del paciente, y usar *end-points* clínicos homogéneos predefinidos (supervivencia global, SLE y supervivencia libre de EICR).

La comparación entre DNE 7/8 y haplotrasplante debería tener en cuenta la fuente (MO *vs.* SP en ambas modalidades), así como el tipo de haplotrasplante (ATG, CF-post, depleción alfa-beta T). Pero no hay estudios de calidad (aleatorizados ni basados en bases de datos) que hayan analizado estos aspectos. Lo mismo ocurre con la comparación entre haplotrasplantes y trasplantes de SCU. La comparación indirecta entre ambos procedimientos de los estudios *0603* y *0604* del National Marrow Donor Program (NMDP)/Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR) sugieren resultados similares entre ambos procedimientos[11]. Un estudio prospectivo aleatorizado de la Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN) que compara prospectivamente ambas modalidades (trasplante de SCU con 2 unidades *vs.* trasplante haploidéntico) y que tiene como *end-point* primario la SLE a 2 años está en fase avanzada de desarrollo.

› Elección según la fuente de células madre

Los 3 posibles orígenes de las células pueden ser la MO, la SP y la SCU. Tanto con donantes emparentados como no emparentados los resultados de supervivencia han sido similares para MO y SP. La recuperación hematológica es más rápida y el rechazo del injerto menos frecuente con SP, mientras que la incidencia de EICR crónica tiende a ser superior con la SP. Para enfermedades no malignas se prefiere la MO por la menor incidencia y severidad de EICR. Tradicionalmente, la MO ha sido utilizada como fuente en los trasplantes haploidénticos con ciclofosfamida postrasplante, la MO estimulada con G-CSF en los haplotrasplantes con ATG y la SP en los haplotrasplantes con depleción alfa-beta de linfocitos T. No hay estudios prospectivos que comparen estas estrategias. Cuando se usa CF-post, la SP parece asociarse a mayor riesgo de EICR aguda y crónica, y menor riesgo de recaída en pacientes con leucemia aguda[12].

› Conclusiones

La selección de pacientes para alotrasplante y la correspondiente selección de donante deberían entenderse como situaciones de medicina altamente personalizada en las que los datos disponibles basados mayoritariamente en estudios de cohortes deberían individualizarse para cada paciente concreto, su situación clínica, la situación de su enfermedad y las opciones de donantes disponibles. Un hermano HLA idéntico o en su defecto un DNE HLA 8/8 compatible son las opciones preferibles para la mayor parte de los pacientes (Figura 1)[13]. La indicación de trasplante de donante alternativo debería establecerse selectiva-

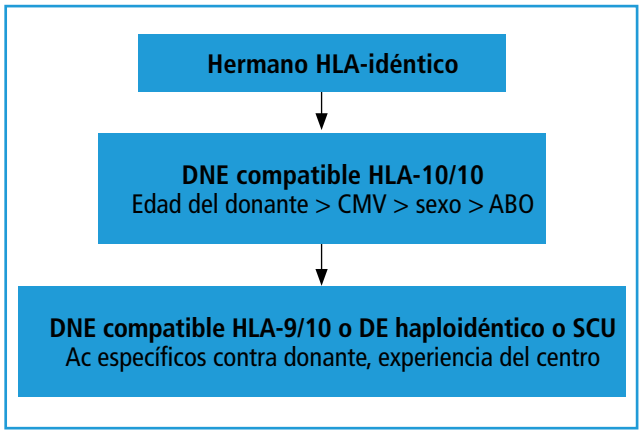


Figura 1. Algoritmo de selección de donantes para pacientes adultos con enfermedades hematológicas malignas[13]. ABO: compatibilidad de grupos sanguíneos ABO; Ac: anticuerpos; CMV: estatus serológico para citomegalovirus; DE: donante emparentado; DNE: donante no emparentado; SCU: sangre de cordón umbilical; sexo: evitar donante mujer que ha tenido embarazos para receptor varón.

mente. La SCU puede tener preferencia para determinados pacientes pediátricos y minorías étnicas, pero menos utilidad práctica para pacientes de peso elevado. La elección entre un DNE HLA 7/8 o un donante emparentado haploidéntico debe individualizarse para cada paciente concreto y está actualmente muy ligada a la práctica de cada centro. La variada disponibilidad permite que hoy en día virtualmente todo paciente para quien se considere necesario un alotrasplante disponga de donante.

› Bibliografía

1. European Federation for Immunogenetics (EFI). Standars for Histocompatibility & Immunogenetics Testing. Version 7; 2018.
2. Dehn J, Spellman S, Hurley CK, Shaw BE, Barker JN, Burns LJ, et al. Selection of Unrelated and Cord Blood Units for Hematopoietic Cell Transplantation: Guidelines from NMDP/CIBMTR. Blood. 2019 Sep 19;134(12):924-34.
3. Yakoub-Agha I, Mesnil F, Kuentz M, Boiron JM, Ifrah N, Milpied N, et al.; French Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapy. Allogeneic marrow stem-cell transplantation from human leukocyteantigen-identical siblings versus human leukocyte antigen-allelic-matched unrelated donors (10/10) in patients with standard risk hematologic malignancy: a prospective study from the French Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapy. J Clin Oncol. 2006 Dec 20;24(36):5695-702.
4. Pidala J, Lee SJ, Ahn KW, Spellman S, Wang HL, Aljurf M, Askar M, et al. Nonpermissive HLA-DPB1 mismatch increases mortality after myeloablative unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation. Blood. 2014 Oct 16;124(16):2596-606.
5. Shaw BE, Logan BR, Spellman SR, Marsh SGE, Robinson J, Pidala J, et al. Development of an Unrelated Donor Selection Score Predicyive of Survival after HCT: Donor Age Matters Most. Biol Blood Marrow Transplant. 2018 May;24(5):1049-56.
6. Peterdorf EW, Gooley TA, Malkki M, Bacigalupo AP, Cesbron A, Du Toit E, et al.; International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell Transplantation. HLA-C expression levels define permissible mismatches in hematopoietic cell transplantation. Blood. 2014 Dec 18;124(26):3996-4003.
7. Spellman S, Bray R, Rosen-Bronson S, Haagenson M, Klein J, Flesch S, et al. The detection of donor-directed, HLA-specific alloantibodies in recipients of unrelated hematopoietic cell transplantation is predictive of graft failure. Blood. 2010 Apr 1;115(13):2704-8.
8. Eapen M, Klein JP, Ruggeri A, Spellman S, Lee SJ, Anasetti C, et al. Impact of allele-level HLA matching on outcomes after myeloablative single unit umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancies. Blood. 2014 Jan 2;123(1):133-40.
9. Iacobelli S; EBMT Statistical Committee. Suggestions on the use of statistical methodologies in studies of the European Group for Blood and Marro Transplantation. Bone Marrow Transplant. 2013 Mar;48 Suppl 1:S1-37.
10. Gale RP, Eapen M. Who is the best alternative allotransplant donor? Bone Marrow Transplant. 2015 Jun;50 Suppl 2:S40-2.
11. Brunstein CG, Fuchs EJ, Carter SL, Karanes C, Costa LJ, Wu J, et al.; Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. Alternative donor transplantation after reduced intensity conditioning: results of parallel phase 2 trials using partially HLA-mismatched related bone marrow or unrelated double umbilical cord grafts. Blood. 2011 Jul 14;118(2):282-8.
12. Bashey A, Zhang MJ, McCurdy SR, St Martin A, Argall T, Anasetti C, et al. Mobilized peripheral blood stem cells versus unstimulated bone marrow as a graft source for T-cell-replete haploidentical donor transplantayion using post-transplant cyclophosphamide. J Clin Oncol. 2017 Sep 10;35(26):3002-9.
13. Ayuk F, Balduzzi A. Donor selection for Adults and Pediatrics. En: Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N (eds.). The EBMT Handbook. EBMT; 2019.

Challenges in the diagnosis, classification and assessment of response of chronic graft-*versus*-host disease in clinical practice

Mary E. D. Flowers, Paul J. Martin
Clinical Research Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center and Department of Medicine, University of Washington, Seattle, Washington (USA)

› Abstract

Chronic graft-*versus*-host disease (GVHD) is a common late complication of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HCT) that results in poor quality of life and, when severe, is associated with increased non-relapse mortality. Chronic GVHD has a wide range of pleomorphic manifestations, and many complications can emerge from both GVHD-associated immunodeficiency and organ dysfunction, and from the treatment. While advances have been made in better understanding of chronic GVHD pathobiology, better clinical trial design and the rise of new treatments targeting its pathobiology, recognizing chronic GVHD and distinguishing it from acute GVHD and other problems can be challenging. Here we review the diagnosis, classification and assessment of response of chronic GVHD and discuss some of the challenges faced in clinical practice.

› Introduction

Chronic GVHD is a syndrome with a wide range of clinical manifestations, and many complications can emerge from both the disease (i.e., GVHD-associated immunodeficiency and organ dysfunction) and its treatment[1,2]. While advances have been made in better understanding of chronic GVHD pathobiology, better clinical trials design and the rise of new treatments being evaluated for this condition, recognizing chronic GVHD and distinguishing it from acute GVHD and other problems can be challenging. Here we review the diagnosis, classification and assessment of response of chronic GVHD and some of their challenges in clinical practice.

› Diagnosis and classification

Until the 90' decade, acute and chronic GVHD were distinguished based on whether immune mediated organ dysfunction occurred at or before 100 days or greater than 100 days after HCT[1,3]. Acute GVHD was clinically diagnosed when diffuse maculopapular rash, erythroderma, nausea, vomiting, anorexia, profuse diarrhea, ileus or cholestatic hepatitis (inflammatory manifestations) occur at or before day 100 after HCT. In 2004, the National Institutes of Health (NIH) GVHD consensus conference clarified that these manifestations occurring after day 100 they should still be categorized as "acute" GVHD[4]. Specifically, a patient with hepatic (transaminase elevation, cholestasis) or GI involvement (stomach, intestinal, colon dysfunction causing nausea, vomiting, diarrhea or weight loss) after day 100 without concomitant diagnostic or distinctive manifestations of chronic GVHD is now categorized as *late* acute GVHD (i.e., *de novo* late acute, persistent late acute or recurrent late acute). Chronic GVHD is characterized by clinical features that differ from the typical dermatitis, gastroenteritis and cholestatic liver manifestations of acute GVHD (Table 1) and generally involves several organs or sites.

The diagnosis and classification criteria by both the 2005 and 2015 NIH reports recognizes two major GVHD categories of acute and chronic GVHD with 2 subcategories each (Table 2)[4,5]. Approximately 40% of patients with GVHD after day 100 do not meet criteria for NIH chronic GVHD at presentation and instead have "late" acute GVHD[6,7]. Figure 1 displays the NIH GVHD categories at presentation with the proportions of patients previously considered to have chronic GVHD by historical criteria who met the 2005 NIH chronic GVHD subcategory of "classic" or "overlap", and for those who were reclassified as "late" acute GVHD (i.e., recurrent

Table 1. Clinical features of chronic graft-versus-host disease (GVHD)

Organ or site	Diagnostic (*sufficient for diagnosis*)	Distinctive[a] (*insufficient alone for diagnosis*)	Other or unclassified entities[b]	Features seen in both acute and chronic GVHD
Skin	Poikiloderma Lichen planus-like Sclerosis Morphea-like Lichen sclerosis-like	Depigmentation Papulosquamous		Erythema Maculopapular Pruritus
Nails		Dystrophy Onycholysis Nail loss Pterygium ungus		
Scalp/Body hair		Alopecia (scaring or non-scaring) Scaling		
Mouth	Lichen planus-like	Xerostomia Mucoceles Mucosal atrophy Pseudomembranes or ulcers[a]		Gingivitis Mucositis Erythema Pain
Eyes		New dry, gritty or painful eyes (sicca) Keratoconjunctivitis sicca Punctate keratopathy	Photophobia Periorbital hyperpigmentation	
Genitalia	Lichen planus-like Lichen sclerosis-like **Female:** Vagina scarring or stenosis Clitoral or labial agglutination **Male:** Phymosis Urethral scarring or stenosis	Erosions[a] Fissures[a] Ulcers[a]		
GI tract	Esophageal web Esophageal stricture or stenosis		Exocrine pancreatic insufficency	Diarrhea Anorexia Nausea or emesis Failure to thrive Weight loss
Liver				Total bilirubin, alkaline phosphatase or ALT > 2 × ULN
Lung	Bronchiolitis obliterans diagnosed by biopsy Bronchiolitis obliterans syndrome (BOS)c		Cryptogenic organizing pneumonia (COP[d]) Restrictive lung disease[d]	
Muscles, fascia, joints	Fasciitis Joint stiffness or contractures due to sclerosis	Myositis Polymyositis		
Hematopoietic and immune			Thrombocytopenia Eosinophilia Hypo- or hyper- gammaglobulinemia Autoantibodies (AIHA, ITP) Raynaud's phenomenon	
Others			Effusionse Nephrotic syndrome Myasthenia gravis Peripheral neuropathy	

Modified from reference 6

[a] In all cases infection, drug effect, malignancy, endocrine causes must be excluded as applicable; [b] can be acknowledged as part of chronic GVHD manifestations if diagnosis is confirmed; [c] BOS can be diagnostic for lung chronic GVHD only, if distinctive sign or symptom present in another organ; [d] these pulmonary manifestations are under investigation or unclassified; [e] pericardium, pleural or ascites

AIHA: autoimmune hemolytic anemia; ALT: alanine aminotransferase; ITP: idiopathic thrombocytopenic purpura; UNL, upper limit of normal

Table 2. National Institutes of Health (NIH) graft-*versus*-host disease (GVHD) categories[4,5]

Acute GVHD[a]
• Classic acute GVHD (onset within day 100)
• Late acute GVHD (i.e., persistent, recurrent, or late-onset after day 100)
Chronic GVHD[b]
• Classic chronic GVHD
• Overlap syndrome (features of chronic and acute GVHD present)

[a] Features of chronic GVHD absent; [b] features of chronic GVHD required for initial diagnosis include a) at least one diagnostic sign or b) one distinctive sign confirmed by biopsy, other tests, or by radiography in the same or another organ, and exclusion of other diagnoses
See Table 1 for chronic GVHD diagnostic and distinctives features

late acute, persistent late acute or *de novo* onset late acute GVHD as reported by several investigators[6-9].

Comparison of reported criteria overtime for the diagnosis and grading of severity of chronic GVHD is displayed on Table 3[10]. The NIH diagnostic criteria for chronic GVHD changed little between 2005 and 2015. Per the 2015 NIH criteria, the diagnosis of chronic GVHD requires a) at least 1 diagnostic feature resembling several collagen vascular diseases that may affect one or multiple sites including skin, eyes, mouth, gastrointestinal tract, lungs, serosae and skeletal muscles or b) 1 distinctive manifestation of chronic GVHD confirmed by biopsy or other testing of the same or other involved organ[5]. "Diagnostic" manifestations sufficient by themselves to establish the diagnosis of chronic GVHD may be found in the skin, mouth, GI tract, lung, fascia, and genitalia (i.e., lichen planus or lichen sclerosis, poikiloderma, sclerosis, or esophageal webs). There are no diagnostic features of the nails, eyes, liver, or other organs. If the lung is the only site of chronic GVHD without a distinctive manifestation elsewhere, then a lung biopsy showing bronchiolitis *obliterans* is required to establish an initial diagnosis of chronic GVHD for enrollment in clinical trials. "Distinctive" criteria are clinically suspicious for chronic GVHD but are not sufficient to establish the diagnosis because other etiologies could account for the manifestations. Therefore, so a confirmatory test is required. Examples of distinctive features are papulosquamous lesions, oral ulcers, onycholysis, or dry gritty eyes. Examples of con-

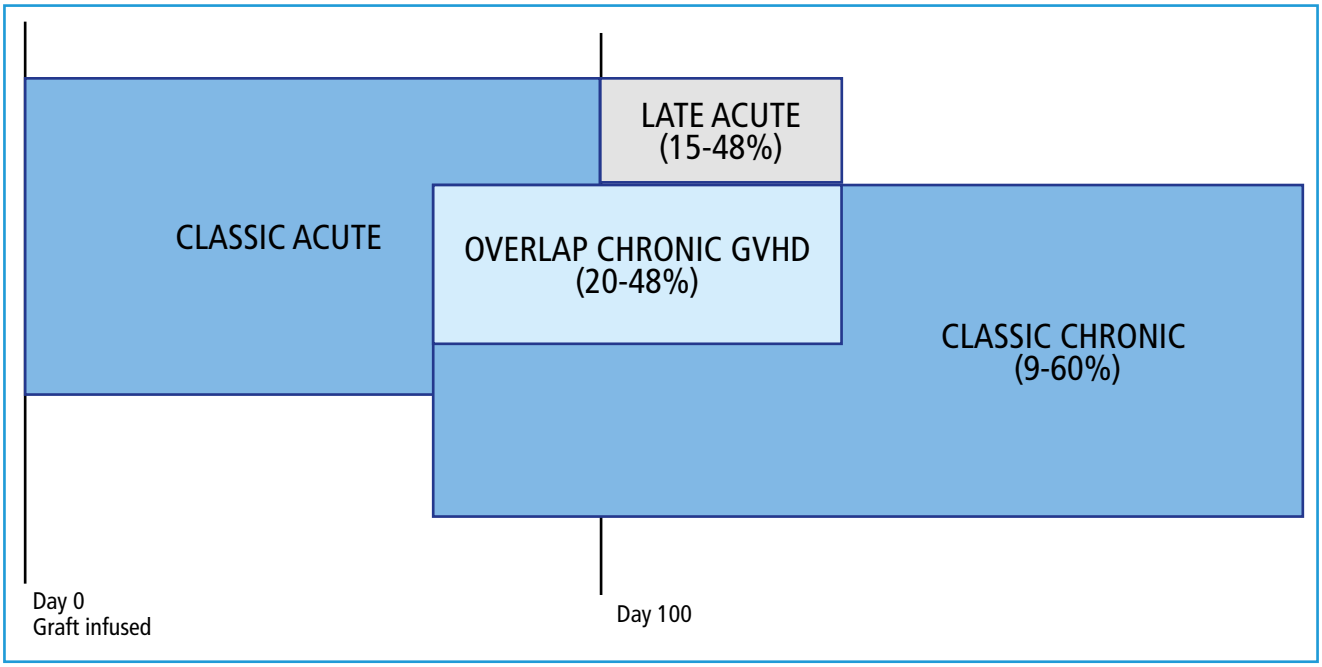


Figure 1. Two main graft-*versus*-host disease (GVHD) categories (acute and chronic) with 2 subcategories each as recognized by 2005 National Institutes of Health (NIH) diagnostic and classification report[4,5]. In parenthesis are the proportion of patients previously considered to have chronic GVHD by historical criteria by several investigators who met the NIH chronic GVHD subcategory of "classic" or "overlap", and for those who were reclassified as "late" acute GVHD (i.e., recurrent late acute, persistent late acute or *de novo* late acute GVHD that occurred after day 100) because lacking chronic GVHD manifestation required for the diagnosis by the NIH criteria[6-9].

Table 3. Comparison of proposed criteria overtime for the diagnosis and grading of severity of chronic graft-*versus*-host disease (GVHD)[a]

	Seattle Criteria[1]		NIH Criteria (2005 and 2015)	
	Original	Revised		
DIAGNOSIS				
	NA	NA	Based on either the presence of specific diagnostic signs or distinctive signs accompanied by additional confirmation (e.g., biopsy or other objective diagnostic test) in at least one target organ (skin & appendages, mouth, eyes, genitalia, esophagus, lungs, and muscles & fascia)	
SEVERITY SCORING				
Limited	Limited skin AND/OR limited hepatic involvement	Limited skin AND/OR limited hepatic involvement OR single organ sicca syndrome (eyes, mouth, vagina)	Mild	No more than two organs with score[b] of 1, except for lung
Extensive	Generalized skin involvement AND/OR major hepatic complications AND/OR an isolated sicca syndrome of the eyes, mouth AND/OR any other organ involvement	Generalized skin involvement AND/OR major hepatic complications AND/OR multiple organs involved (more than two, including 'nails'), the presence of skin sclerosis / serositis or fasciitis, bronchiolitis obliterans, < 60% KPS/LPS score, or weight loss > 15% Severe	Moderate	Any other severity scoring[b] not included in the mild or severe categories
			Severe	At least one organ with a score[b] of 3 or a lung score[†] of 2

[a] Modified from reference 10. Specific severity of manifestations of chronic GvHD in skin/appendages; [b] based on severity of features specified for each GVHD 8 target organs (skin, mouth, eyes, genitalia, liver, lungs and muscle and fasciae) and measured on a scale of 0 (absent) to 3 (severe) according to impact of function

firmatory tests are tissue biopsies (i.e., skin, mouth, lung, liver, GI, genital), organ-specific testing (i.e., pulmonary function tests, Schirmer tests), imaging (i.e., a barium swallow showing an esophageal ring), or evaluation by a specialist such as an ophthalmologist or gynecologist confirming GVHD. Because the differential diagnosis for liver test abnormalities and GI symptoms in the posttransplant setting is broad, histopathologic confirmation may be especially important as a prior study reported incorrect attribution to GVHD in many cases[11,12].

Manifestations that are diagnostic of chronic GVHD (Table 1) are categorized as *classic chronic* regardless of when they occur, those consistent only with acute GVHD manifestations that occur after day 100 are defined as *late acute* (i.e., persistent, recurrent or *de novo* late acute GVHD), and those with concurrent presentation of chronic and acute manifestations defines the *overlap subtype* of chronic GVHD. To address areas of controversy or confusion, such as the *overlap* chronic GVHD subcategory and the distinction between active disease and irreversible damage, the 2015 NIH diagnosis and classification report updated criteria for chronic GVHD involvement of mouth, eyes, genitalia, and lungs as well as focus attention on the causes of organ-specific abnormalities and on the attribution of organ-specific abnormalities to chronic GVHD[5]. A position statement by experts from the European Society for Blood and Marrow Transplantation, the NIH and the Center for International Blood and Marrow Transplant Research proposed consensus definitions for many key terms for both acute and chronic GVHD and provided an simple schematic representation of the types of GVHD (Figure 2)[10].

Pathophysiological insights of chronic GVHD have included involvement of alloactivated T cells from the graft, Th17/Tc17 differentiation, defective negative selection in thymus, insufficient generation of Treg cells, T and B cell axis (i.e., T cell help for B cells and antibody production), macrophage activation and sequestration and profibrogenic cytokines[13,14]. Clinical manifestations based on the insights of pathophysiology of chronic GVHD include inflammation, fibrosis and de-

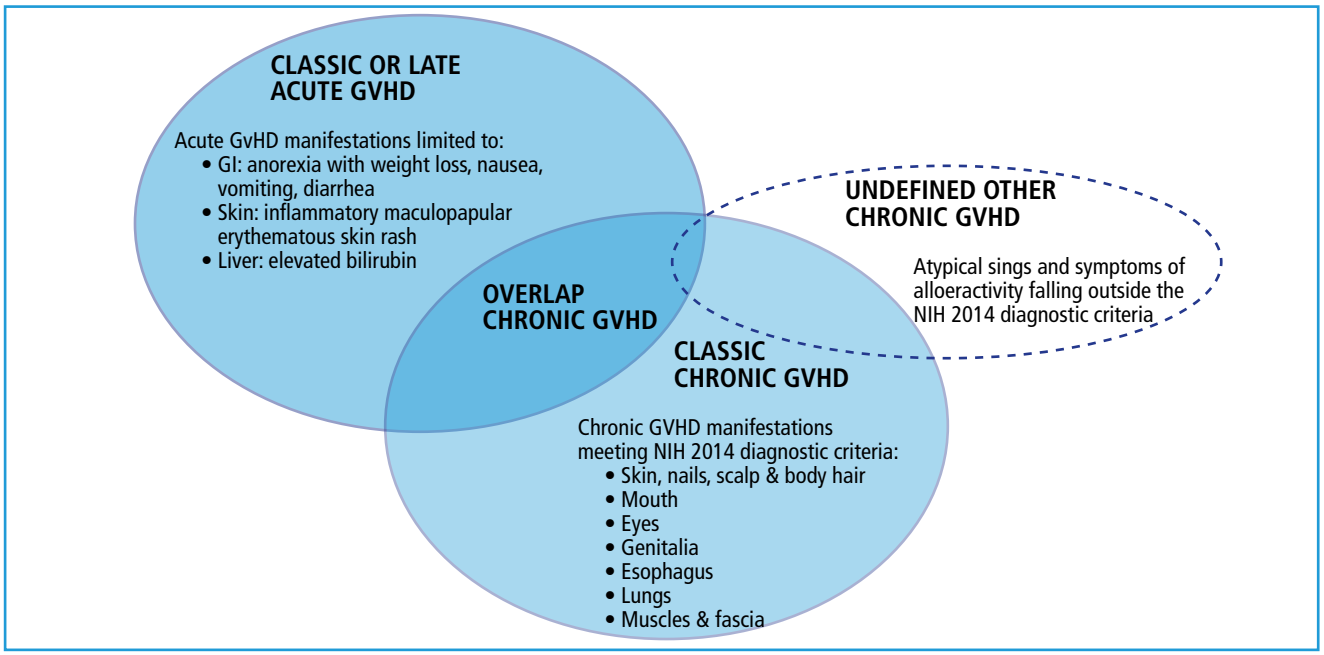


Figure 2. Schematic representation of the types of graft-*versus*-host disease (GVHD) by an international task on standardized terminology and guidance for GVHD assessment by Schoemans HM *et al.*[10].

Table 4. Chronic graft-*versus*-host disease (GVHD) manifestations based on pathophysiology

Pathophysiology	Manifestations	Onset of response
Inflammation	Cutaneous erythema	Weeks
	Oral lichenoid changes	
	Diarrhea	
	Abnormal liver function	
Fibrosis	Cutaneous sclerosis	Months
	Fasciitis and joint disease	
	Panniculitis	
Destruction	Oral and ocular sicca	Not seen
	Bronchiolitis *obliterans*	
	Vitiligo	

struction (permanent damage or sequelae) (Table 4). We refer the reader to the review on the biology of chronic GVHD by the task force from the 2014 NIH Consensus Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease[13] and to a comprehensive review series on chronic GVHD recently published in Blood which include a review on the classification systems for chronic GVHD[14-16].

› *Common clinical manifestations*

The skin and mouth are most commonly involved and are judged according to physical examination and biopsy results (Figure 3). Several recourses and atlases on skin and mouth physical findings are available[17-19]. Initial manifestations include lichen-planus-like lesion (violaceous, flat-topped and usually less confluent than the rash of acute GVHD) or dry papulosquamous lesions(resembling eczema or actinic keratoses). Later skin involvement includes sclerotic changes (morphea, sclerosis, fasciitis, and panniculitis) and poikiloderma (thinning of the epidermis and dermis, telangiectasias, and mottled pigmentation). Both sclerosis and poikiloderma may be associated with poorly healing skin ulcers. Oral involvement includes lichen-planus-like lacy buccal involvement, xerostomia from salivary gland dysfunction and food sensitivity. Oral pain, erythema and non-healing ulcers can occur. Fibrosis involving buccal tissues occurs late and causes decreased jaw range of motion. Many organ manifestations are less common but are associated with disabling symptoms. Eye xerophthalmia and sicca keratoconjunctivitis cause irritation and pain. Bronchiolitis *obliterans* causes dyspnea, wheezing and an obstructive pattern on pulmonary function testing with air trapping on high

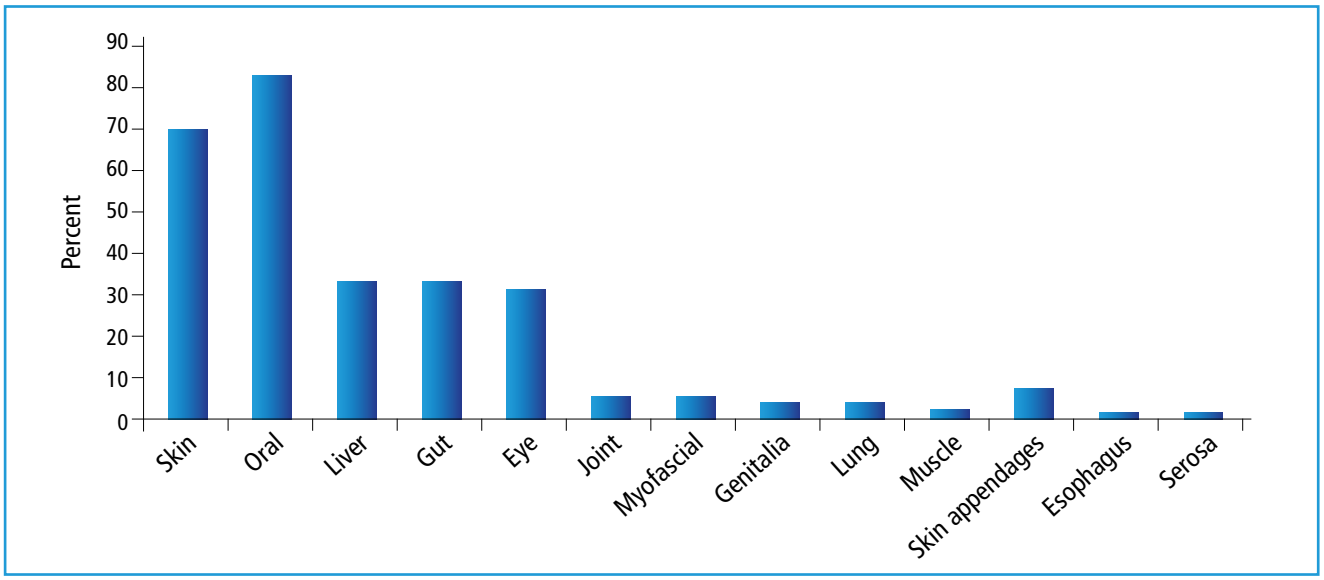


Figure 3. Frequency of organs affected by chronic graft-*versus*-host disease (GVHD) at the time of initiation of systemic treatment per 2005 National Institutes of Health (NIH) criteria. Figure used data from reference 3.

resolution computerized tomography scan of chest. Vulva-vaginal involvement results in ulcers, web formation, and strictures causing discomfort. Arthralgias, myalgias, serositis and neurologic manifestations may occur. Chronic GVHD is also associated with thrombocytopenia, eosinophilia and autoimmune cytopenias.

› *Challenges*

Recognizing chronic GVHD and distinguishing it from acute GVHD and other problems can be challenging. A high level of suspicion for chronic GVHD should be maintained for perturbation in laboratory tests and new or progression of symptoms or signs on examination in a patient specially within the first post-transplant year. Conversely, every problem after transplant is not chronic GVHD. For instance, other conditions can be mislabeled as chronic GVHD, such as a drug rash or eczema (skin); iron overload (liver); hypothyroidism (hair loss and fatigue); joint stiffness, weight loss, nausea, increased fatigue (adrenal insufficiency following corticosteroids discontinuation); among others. Below are two cases illustrating some of nuances that can represent challenges in clinical practice.

› *Case #1*

A patient who is now 6 months after a G-CSF mobilized blood stem cell transplant from an unrelated matched donor develops a new erythematous rash involving 40% total body surface area (BSA) and elevated alanine aminotransferase (4 times above the upper normal of limit range) and has oral lichenoid features affecting 25% of the total oral cavity and reports oral sensitivity but not significantly affecting oral intake. The oral lichenoid features are a diagnostic manifestations of NIH chronic GVHD, thus this patient would be diagnosed with chronic GVHD with skin (score 2), liver (score 1) and mouth (score 1) involvement. Manifestations in Case #1 fit the "overlap" chronic GVHD subcategorization NIH criteria due to the concomitant presentation of acute manifestations (erythematous rash and transaminase elevation) and diagnostic chronic GVHD oral features. If oral lichenoid features in Case #1 were asymptomatic, the diagnosis chronic GVHD would still hold, but the grading of the severity in the mouth would be scored as a zero.

› *Case #2*

A patient develops chronic GVHD with liver, skin, oral and gut manifestations with complete response after initial treatment containing corticosteroids. Three months later, during the corticosteroids taper, a new erythematous maculopapular skin rash attributed to GVHD emerges without other manifestations. The development of new or recurrent inflammatory features alone in a patient with a prior diagnosis of chronic

GVHD even if diagnostic features or distinctive are no longer present does not change the diagnosis, since inflammatory features are part of the chronic GVHD syndrome which intermittently can flare up over the course of the disease.

› Assessment of response

Because chronic GVHD is a syndrome of different features that can evolve overtime from inflammation to fibrosis, and to eventually irreversible damage, the assessment of response can be challenging. Systematic assessment of organs involvement attributed to chronic GVHD is essential for early diagnosis, for early recognition of manifestations associated with high morbidity and disability, and for assessment of disease progression and response during treatment. Once the clinical diagnosis of chronic GVHD is made, the extent and severity of each affected organs must be ascertained using the NIH chronic GVHD diagnosis and scoring consensus criteria[5]. Recommended methods for conducting a chronic-GVHD focused evaluation have been published[19].

In our practice[2], comprehensive evaluations are conducted at the time of initial diagnosis, at 3 to 6-month intervals thereafter, and at any time when a major change in therapy is made. Evaluations are also continued until at least 12 months after systemic treatment has ended. Close serial monitoring of all organ systems is essential to ensure early detection, recognition and intervention directed toward reversing or preventing progression of chronic GVHD manifestations and treatment-associated toxicities. Periodic pulmonary function tests are essential for early detection of lung involvement manifested as bronchiolitis obliterans syndrome (BOS). This complication has an insidious onset, and patients may remain asymptomatic until considerable lung function has been lost. We recommend complete pulmonary function testing in all patients before HCT and at approximately 3 months after HCT as a baseline for future comparisons. Follow-up testing should be done at the onset of chronic GVHD and at 3 to 6-month intervals for the first year or more often if testing shows any significant new airflow obstruction or decline in the percent of predicted FEV1. Patient and physician-directed tools to support chronic GVHD monitoring can be found at: http://www.fhcrc.org/en/treatment/long-term-follow-up/information-for-physicians.html.

› Challenges in the assessment of response in clinical practice

Distinction between active disease and irreversible damage (i.e., sequelae from prior GVHD) can be challenging in patients with chronic GVHD. In clinical practice, evaluation of responses to treatment can be challenging and depends on the type of manifestation (i.e., inflammation, fibrosis or destruction) (Table 4). For instance, response to treatment in a patient with inflammatory manifestations (i.e., erythematous macular popular rash, oral lichenoid signs, diarrhea, abnormal liver function tests) are easier to assess, and the onset of response can generally be seen within weeks. In contrast, assessment of treatment responses in patients with deep cutaneous sclerosis or fasciitis with joint contractures is more challenging due to inability of available measurement tools to assess response reliably, the irreversibility of damage caused by severe fibrosis where response is not seen, and because response does not become clinically evident until months after starting treatment, unlike the inflammatory manifestations that typically improve within weeks after starting treatment. Severe manifestations can lead to destruction of normal tissue leading to sequelae such as ocular sicca and severe BOS. These manifestations do not improve after treatment. In patients with moderate to severe BOS, however, stability of pulmonary function tests (PFTs) should be considered as response to a treatment if the prior trajectory of obstructive airway disease showed progression.

Practical considerations to help assessment of response of chronic GVHD for patients with fibrotic manifestations includes: 1) acknowledgement of the trajectory of cutaneous sclerosis or fasciitis with joint contractures (percentage of skin involvement with sclerosis, total skin thickness score, photographic range of motion, etc.) or BOS (PFTs) in the past 6 months before initiation of change of therapy; 2) pre-specification of the organ sites, manifestations and time frame that will be used to assess response (for instance severe ocular sicca or severe BOS attributed to destruction of prior GVHD of eyes and lungs versus lichenoid features, early fasciitis or other inflammatory manifestations); and 3) pre-specification of whether stability of fibrotic manifestation or stability of PFTs (BOS) will be considered as a treatment response based on the trajectory of these manifestations before initiation of a new intervention.

› Conclusion

Systematic evaluation and adherence of a common set of criteria for diagnosis and assessment of response are important to improve the quality of data, compare results of retrospective studies and prospective clinical trials, and make therapeutic recommendations based on quality evidence.

› References

1. Lee SJ, Vogelsang G, Flowers MED. Chronic graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transplant. 2003;9:215-33.
2. Flowers MED, Martin PJ. How we treat chronic graft-versus-host disease. Blood. 2015;125:606-15.
3. Lee SJ, Flowers ME. Recognizing and managing chronic graft-versus-host disease. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2008;2008:134-41.
4. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and Staging Working Group report. Biol Blood Marrow Transplant. 2005 Dec;11(12):945-56.
5. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, et al. National Institutes of Health Chronic Graft-versus-Host Disease Consensus for Clinical Trials: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group Report. Biol Blood Marrow Transplant. 2015 Mar;21(3):389-401.e1.
6. Vigorito AC, Campregher PV, Storer BE, Carpenter PA, Moravec CK, Kiem HP, et al.; National Institutes of Health. Evaluation of NIH consensus criteria for classification of late acute and chronic GVHD. Blood. 2009 Jul 16;114(3):702-8.
7. Jagasia M, Giglia J, Chinratanalab W, Dixon S, Chen H, Frangoul H, et al. Incidence and outcome of chronic graft-versus-host disease using National Institutes of Health consensus criteria. Biol Blood Marrow Transplant. 2007 Oct;13(10):1207-15.
8. Cho BS, Min CK, Eom KS, Kim YJ, Kim HJ, Lee S, et al. Feasibility of NIH consensus criteria for chronic graft-versus-host disease. Leukemia. 2009 Jan;23(1):78-84.
9. Arora M, Nagaraj S, Witte J, DeFor TE, MacMillan M, Burns LJ, Weisdorf DJ. New classification of chronic GVHD: added clarity from the consensus diagnoses. Bone Marrow Transplant. 2009 Jan;43(2):149-53.
10. Schoemans HM, Lee SJ, Ferrara JL, Wolff D, Levine JE, Schultz KR, et al. EBMT-NIH-CIBMTR Task Force position statement on standardized terminology & guidance for graft-versus-host disease assessment. Bone Marrow Transplant. 2018 Nov;53(11):1401-15.
11. Jacobsohn DA, Montross S, Anders V, Vogelsang GB. Clinical importance of confirming or excluding the diagnosis of chronic graft-versus-host disease. Bone Marrow Transplant. 2001;28(11):1047-51.
12. Aki SZ, Inamoto Y, Carpenter P, Storer BE, Sandmaier BM, Lee SJ, et al. Confounding Factors Affecting the National Institutes of Health (NIH) Chronic Graft-Versus-Host Disease Organ-Specific Score and Global Severity. Bone Marrow Transplant. 2016 Oct;51(10):1350-3.
13. Cooke KR, Luznik L, Sarantopoulos S, Hakim FT, Jagasia M, Fowler DH, et al. The Biology of Chronic Graft-versus-Host Disease: a Task Force Report from the National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease. Biol Blood Marrow Transplant. 2017 Feb;23(2):211-34.
14. MacDonald KPA, Hill GR, Blazar BR. Chronic graft-versus-host disease: biological insights from preclinical and clinical studies. Blood. 2017;129(1):13-21.
15. Cutler CS, Koreth J, Ritz J. Mechanistic approaches for the prevention and treatment of chronic GVHD. Blood. 2017;129(1):22-9.
16. Lee SJ. Classification systems for chronic graft-versus-host disease. Blood. 2017;129(1):30-7.
17. Pichard DC, Cowen EW. Diagnosis, Staging, and Treatment of Chronic Graft-Versus-Host Disease. En: Cotliar J (ed.). Atlas of Graft-versus-Host Disease. Springer; 2017. pp. 125-30.
18. Treister N, Duncan C, Cutler C, Lehman L. How we treat oral chronic graft-versus-host disease. Blood. 2012;120(17):3407-18.
19. Carpenter PA. How I conduct a comprehensive chronic graft-versus-host disease assessment [Commentary]. Blood. 2011;118:2679-87.

This work was supported in part by grant CA18029 from the National Cancer Institute at the National Institutes of Health.

Enfermedad del injerto contra el huésped. Nuevas herramientas terapéuticas

Pere Barba
Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona

La enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) aguda y crónica supone una de las principales causas de morbimortalidad en los pacientes que reciben un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH). Los tratamientos disponibles hasta este momento permiten un control de esta complicación en un número todavía insuficiente de pacientes. Además, muchos de estos tratamientos se asocian a efectos adversos severos, especialmente infecciosos. En los últimos años hemos asistido a un mayor conocimiento a nivel biológico de esta complicación, lo que ha permitido el desarrollo de nuevas terapias, tanto farmacológicas como de terapia celular. En este sentido, el uso de células mesenquimales para el tratamiento de la EICH y las manipulaciones del producto de aféresis, como la selección de células CD34+ o la depleción de células CD45RA, han mostrado resultados muy prometedores. Estas y otras novedades terapéuticas, como el uso de ruxolitinib o ibrutinib, serán tratadas en esta ponencia.

NUEVOS RETOS EN EL MANEJO DE LOS PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

Coordinadores: **Dr. Valentín García Gutiérrez.** Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid
Dra. M.ª Teresa Gómez Casares. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria

La leucemia mieloide crónica (LMC) ha estado inmersa en una constante revolución desde el descubrimiento del cromosoma Filadelfia. Los tremendos avances en el conocimiento de la fisiopatogenia de la enfermedad han tenido repercusión tanto en el diagnóstico y el seguimiento de la enfermedad, como en la introducción de dianas terapéuticas que han cambiado el pronóstico de la enfermedad. De esta forma, la LMC ha pasado de ser una enfermedad con una esperanza de vida de 3-5 años en pacientes no candidatos a trasplante, a tener una esperanza de vida similar a la de la población general. Sin embargo, aún quedan importantes retos en el conocimiento y el manejo de la enfermedad; algunos de ellos serán expuestos en este simposio:

• A pesar de los excelentes resultados obtenidos con el tratamiento actual de la LMC, aún observamos un porcentaje de pacientes que no responden de forma adecuada al tratamiento. La Dra. Simona Soverini nos mostrará cuáles son los mecanismos de resistencia a los inhibidores de tirosina cinasa (ITC) actuales, así como las opciones terapéuticas para el manejo de estos pacientes.

• Uno de los mayores éxitos recientes en la LMC es la posibilidad de discontinuación del tratamiento en pacientes que alcanzan y mantienen una respuesta molecular profunda. Sin embargo, aproximadamente la mitad de los pacientes que interrumpen el tratamiento perderán la respuesta, siendo imprescindible su reanudación, desconociéndose los factores implicados en la posibilidad de la discontinuación. El Dr. Sánchez Guijo nos mostrará las estrategias que están siendo evaluadas en el momento actual para incrementar el número de pacientes que puedan llegar a la discontinuación.

• Dentro de las guías y recomendaciones para el manejo y el seguimiento de los pacientes con LMC, las recomendaciones de la European Leukemia Net son sin duda las de mayor seguimiento y difusión. Sin embargo, la última versión se remonta al año 2013, encontrándose en este momento los expertos panelistas actualizándolas. El Dr. Steegmann, miembro del panel de expertos, nos adelantará cuáles son los puntos que están siendo debatidos para la futura versión, así como su opinión en cuestiones clave del manejo actual de los pacientes con LMC.

Por último, el Dr. García Gutiérrez mostrará, a modo de comunicación, los datos de registro de uso de ponatinib en la práctica clínica habitual.

Chronic myeloid leukemia: the paradigm of targeting oncogenic tyrosine kinase signaling and counteracting resistance for successful cancer therapy

Simona Soverini, Luana Bavaro, Margherita Martelli, Sara De Santis, Cecilia Monaldi, Manuela Mancini

Hematology/Oncology "L. e A. Seràgnoli", Department of Experimental, Diagnostic and Specialty Medicine, University of Bologna, Italy

› Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is a rare disease. Nevertheless, the advances in the biology and therapy of CML have set huge milestones in the history of anticancer precision medicine. CML has been the first human malignancy to be associated, almost 60 years ago, to a consistent chromosomal abnormality, the t(9;22)(q34;q11) translocation, resulting in the formation of a shorter chromosome 22 derivative (termed 'Philadelphia [Ph] chromosome' after the name of the city where its discovery took place). Between the 60s and the 90s, a series of pivotal studies revealed that the translocation resulted, on the Ph chromosome, in a BCR-ABL1 fusion gene encoding a deregulated tyrosine kinase that seemed to be necessary and sufficient to induce leukemia. The BCR-ABL1 protein acquires some domains from BCR and others from ABL1[1]. Domains from BCR include an N-terminal coiled-coil oligomerization domain; a Serine/Threonine kinase domain containing a docking site (phosphorylated Tyrosine 177, Y177) for the growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) adapter protein. $p210^{BCR\text{-}ABL1}$ also retains a Ras homolog gene family/Guanine nucleotide exchange factor (Rho/GEF) kinase domain. $p230^{BCR\text{-}ABL1}$ incorporates an additional Calcium-binding domain. Domains from ABL1 include three SRC homology domains: the SH1 is the kinase domain, whereas the SH2 and SH3 domains mediate interactions with other proteins; a long C-terminal region of approximately 600 amino acids encoded by the last exon, which contains proline-rich sequences mediating the interaction of ABL1 with other SH3-containing proteins (like CrkI, an adapter molecule whose phosphorylation serves as readout for ABL1 kinase activation), a DNA-binding domain and an actin-binding domain. This region also contains nuclear localization and nuclear export signals controlling the nuclear-cytoplasmic shuttling of the kinase.

The reason why the native ABL1 kinase has a tightly regulated activity whereas BCR-ABL1 is constitutively active is due to the fact that BCR-ABL1 loses the N-terminal "cap" (N-cap), a region with a signal sequence for myristoylation which plays a critical role in kinase regulation. The N-terminal myristic acid group of ABL1 binds a deep hydrophobic pocket in the C-terminal lobe of the kinase domain. Interaction of the myristoylated N-cap with the C-terminal lobe has a key auto-inhibitory function. Loss of this region, together with the acquisition of BCR sequences encompassing the oligomerization domain and Y177, impair the physiologic control of the kinase.

How can BCR-ABL1 promote cellular transformation? The ABL1 protein is implicated in a series of cellular processes ranging from regulation of cell growth and survival to oxidative stress and DNA-damage responses, cell migration and transmission of information about the cellular environment through integrin signaling. Malignant transformation by BCR-ABL1 results from altered adhesion to bone marrow stroma cells and extracellular matrix, and constitutively active mitogenic signaling and reduced apoptosis[2] via the deregulation of the RAS/RAF/MEK/ERK, the JAK2/STAT and the PI3K/AKT/mTOR pathways[3].

› Targeting BCR-ABL1

Being caused by a single deregulated protein that exhibits a 'druggable' gain of function and is expressed in leukemic cells but not in normal cells, CML is considered a paradigm for precision medicine. As such, CML became the first human malignancy for whom the 'dream' of targeted therapy became true. Based on the structural and functional features of BCR-ABL1, two inhibitory

Table 1. List of approved ATP-competitive inhibitors and respective indications

First generation	
Imatinib	First-line and second/subsequent-line*, all disease phases
Second generation	
Dasatinib	First-line and second/subsequent-line, all disease phases
Nilotinib	First-line and second/subsequent-line, CP and AP only
Bosutinib	Third-line or when imatinib, dasatinib or nilotinib are not considered appropriate, all disease phases
Third generation	
Ponatinib	Second/subsequent-line if T315I+ or when no other TKI is considered appropriate, all disease phases

* Being the weakest of all, imatinib is rarely considered as second/subsequent line option, especially in case of resistance

strategies have been pursued: 1) ATP-competitive inhibitors, that bind the kinase domain in the cleft between the N-terminal lobe and the C-terminal lobe; and 2) allosteric inhibitors, that do not compete with ATP binding but rather bind to sites that are important regulators of kinase activity.

› *ATP-competitive inhibitors*

This is the first strategy that was historically followed, with imatinib mesylate and its successors. The catalytic domains of all eukaryotic kinases have a highly conserved 'dual lobe' structure. In the interface between the two lobes (N-terminal and C-terminal) there is a cleft, where a series of highly conserved amino acids form the ATP-binding and catalytic sites. The activation state of kinases depends on the position of the so called 'Activation loop' (A-loop), a portion of the C-terminal lobe, which in ABL1 comprises amino acid residues 381-402. In the active form of the kinase, the A-loop swings away from the catalytic center of the kinase ('open' conformation). The three N-terminal residues of the A-loop (amino acids 381-383) are a highly conserved D-F-G (Aspartate-Phenylalanine-Glycine) motif that is essential for catalytic activity. The C-terminal portion of the A-loop creates a platform for substrate binding. Although the conformation of the A-loop is highly conserved in kinases when they are in their active, open conformation, there are considerable differences in the inactive (closed) conformations. Crystal structure analysis of imatinib in complex with BCR-ABL1 showed that imatinib selectively binds to the inactive conformation of the kinase[4-6]. Imatinib thus traps the BCR-ABL1 oncoprotein once it transits through its inactive conformation. The resulting inhibition of auto- and substrate phosphorylation blocks proliferation and induces apoptosis of CML cells[7-9].

The issue of drug resistance and the fact many patients still had detectable *BCR-ABL1* transcripts in their blood and bone marrow led to the development of second- (and third-) generation TKIs: dasatinib, nilotinib, bosutinib and ponatinib (Table 1). They are more potent and/or more specific in BCR-ABL1 inhibition. Dasatinib and bosutinib can also bind the active conformation of the kinase.

› *Allosteric inhibitors*

More recently, several allosteric regions in the BCR-ABL1 molecule have been identified and shown to be potentially druggable. As anticipated above, the myristoylated N-cap of ABL1 plays a key role in kinase autoinhibition by binding a deep hydrophobic pocket in the C-terminal lobe. Binding of the myristoyl group to this pocket induces a conformational change in the C-terminal helix of the kinase domain that is necessary for binding of the SH3-SH2 clamp, which keeps the kinase inactive. Although this region is lost in BCR-ABL1, this control mechanism can be exploited by developing molecules that can mimick myristate binding. ABL001 or asciminib is one such molecule and is in advanced clinical development. ABL001 and second-generation TKIs have similar cellular potencies but non-overlapping patterns of resistance mutations (see below), and combinations of both might be the best strategy to prevent resistance in the first-line setting.

› Clinical resistance to BCR-ABL1 inhibitors: mechanisms and frequency

In 2001, when imatinib was still undergoing phase I-II clinical evaluation, an identical substitution of Threonine to Isoleucine at residue 315 (T315I) in six out of nine patients with advanced phase CML who had relapsed despite continued treatment was identified[10]. Threonine 315 was later defined 'the gatekeeper' residue, because it strategically controls the accessibility

Table 2. List of the most frequent BCR-ABL1 kinase domain mutations resistant to ATP-competitive inhibitors reported in published studies

Imatinib						Nilotinib	Dasatinib	Bosutinib	Ponatinib
M237V	L273M	F311L	E355D/G	V379I	A397P	Y253F/H	V299L	V299L	T315M
M244V	E275K/Q	**T315I**	F359V/I/C	A380T	S417F/Y	E255K/V	**T315I**	**T315I**	T315L
L248R	D276G	F317L/V/I/C	D363Y	F382L	I418S/V	**T315I**	F317L/V/I/C	?	
G250E/R	T277A	F359V/I/C	L364I	L384M	S438C	F359V/I/C			
Q252R/H	E279K	Y342H	A365V	L387M/F	E453G/K				
Y253F/H	V280A/I	M343T	L370P	M388L	E459K/V				
E255K/V	V289A	A344V	V371A	Y393C	P480L				
E258D	V299L	M351T	E373K	H396R/P	F486S				

The T315I is highlighted in bold. The question mark indicates that, given the limited clinical experience, additional resistant mutations might still be uncovered

of the ATP-binding pocket. Threonine 315 is essential for imatinib, dasatinib, nilotinib and bosutinib binding, but not for ATP binding. Hence, the catalytic activity is preserved in the imatinib-resistant T315I mutant. Accordingly, the T315I confers resistance also to all the currently approved second-generation TKIs (dasatinib, nilotinib and bosutinib) and only the third-generation TKI ponatinib has demonstrated *in vitro* and *in vivo* activity against this mutant. As the number of imatinib-resistant patients increased, sequencing of their kinase domains revealed a wide spectrum of additional mutations. At present, more than 50 different mutation hotspots are known (Table 2). Much smaller spectra of resistant mutations are known for second-generation TKIs (Table 2) and these spectra are essentially non-overlapping (with the exception of the T315I mutation, as anticipated). BCR-ABL1 kinase domain mutation screening is recommended in patients who fail TKI therapy, since detection of specific mutations influences the choice of the second- or subsequent-line TKI[11]. To this purpose, next-generation sequencing (NGS) might soon replace Sanger sequencing in light of its greater sensitivity.

Sequencing of TKIs in patients who fail multiple lines of therapy has more recently led to a increase in compound mutation frequency. A compound mutant arises when two mutations are acquired by the same BCR-ABL1 molecule, thus by the same clone, as opposed to polyclonality where two clones acquire a single mutation each[12]. Detection of compound mutants might have important clinical implications. According to recent studies, the IC_{50} values of second-generation TKIs and of ponatinib experimentally derived for many compound mutants are much higher than those each single mutant would exhibit[13,14]. Such *in vitro* data suggest that i) the great majority of compound mutants are likely to be highly resistant to all second-generation TKIs; and ii) some compound mutants might be challenging even for ponatinib.

Kinase domain mutations are the most extensively studied mechanism of TKI resistance (mainly because of its actionability), but they are neither the only nor even the most frequent one: they can be detected in no more than 30% of CML patients in chronic phase who fail first-line treatment[15]. Little, however, is known about other mechanisms, that have been investigated only in cell line models or in very small subsets of patients.

› Conclusions

BCR-ABL1 is by far the most extensively studied oncogenic tyrosine kinase as well as the first that could successfully be therapeutically targeted. In the great majority of patients, TKIs result in stable and deep molecular responses –so that some patients can discontinue the treatment and can be considered 'functionally cured'. As in all cancers, tumor escape mechanisms have been observed –mainly the acquisition of point mutations impairing TKI binding, fostered by the high genetic instability of leukemic cells– but proper choice and sequencing of the five TKIs currently available for first- or second-/subsequent-line treatment of CML patients enables to prevent or to counteract resistance in the majority of cases.

› References

1. Panjarian S, Iacob RE, Chen S, Engen JR, Smithgall TE. Structure and dynamic regulation of Abl kinases. J Biol Chem. 2013;288(8):5443-50.
2. Sattler M, Griffin JD. Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene. Semin Hematol. 2003;40(2 Suppl 2):4-10.
3. Melo JV, Deininger MW. Biology of chronic myelogenous leukemia--signaling pathways of initiation and transformation. Hematol Oncol Clin North Am. 2004;18(3):545-68, vii-viii.
4. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. Science. 2000;289(5486):1938-42.
5. Cowan-Jacob SW, Guez V, Fendrich G, Griffin JD, Fabbro D, Furet P, et al. Imatinib (STI571) resistance in chronic myelogenous leukemia: molecular basis of the underlying mechanisms and potential strategies for treatment. Mini Rev Med Chem. 2004;4(3):285-99.
6. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. Cancer Cell. 2002;2(2):117-25.
7. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. Nat Med. 1996;2(5):561-6.
8. Gambacorti-Passerini C, le Coutre P, Mologni L, Fanelli M, Bertazzoli C, Marchesi E, et al. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. Blood Cells Mol Dis. 1997;23(3):380-94.
9. Deininger MW, Goldman JM, Lydon N, Melo JV. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. Blood. 1997;90(9):3691-8.
10. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. Science. 2001;293(5531):876-80.
11. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European Leukemia Net. Blood. 2011;118(5):1208-15.
12. Shah NP, Skaggs BJ, Branford S, Hughes TP, Nicoll JM, Paquette RL, et al. 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.
13. Zabriskie MS, Eide CA, Tantravahi SK, Vellore NA, Estrada J, Nicolini FE, et al. BCR-ABL1 compound mutations combining key kinase domain positions confer clinical resistance to ponatinib in Ph chromosome-positive leukemia. Cancer Cell. 2014;26(3):428-42.
14. 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(9):3550-5.
15. Soverini S, Martinelli G, Rosti G, Iacobucci I, Baccarani M. Advances in treatment of chronic myeloid leukemia with tyrosine kinase inhibitors: the evolving role of Bcr-Abl mutations and mutational analysis. Pharmacogenomics. 2012;13(11):1271-84.

Conflicts of interest: SS, consultancy for Incyte Biosciences, Bristol-Myers Squibb, Novartis. The remaining authors declare no conflicts of interest.

Nuevas estrategias terapéuticas en la discontinuación del tratamiento en la leucemia mieloide crónica

Fermín Sánchez-Guijo Martín
Servicio de Hematología, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL)-Hospital Universitario de Salamanca

› Introducción

No cabe duda de que el área que suscita el mayor interés actual dentro de la leucemia mieloide crónica (LMC) es la discontinuación del tratamiento con inhibidores de la tirosina cinasa (ITC)[1]. Durante los primeros años tras la introducción de imatinib, los datos biológicos sugerían que este y los nuevos ITC que se estaban desarrollando no tenían capacidad para erradicar a la célula *stem* leucémica[2] y, por tanto, los tratamientos con estos fármacos, aunque conseguían respuestas espectaculares y cambiar la historia natural de la enfermedad, habían de ser indefinidos, y además la adherencia al tratamiento se mostró como un factor clave para obtener una respuesta molecular profunda[3].

Sin embargo, con los primeros casos de discontinuación del tratamiento en pacientes con respuesta profunda y mantenida, generalmente con motivo de toxicidad o embarazo, este axioma se vio cuestionado[4,5] y se sentaron las bases para el desarrollo del primer ensayo clínico prospectivo de discontinuación, el estudio *STIM* del grupo francés. En este ensayo se incluyeron 100 pacientes que habían alcanzado una respuesta molecular completa (RMC), definida como BCR-ABL ≤ 0,001% IS durante al menos 2 años[6]. Los resultados a largo plazo de este estudio (posteriormente denominado *STIM1*), con un seguimiento medio de 77 meses tras la discontinuación, mostraron que la supervivencia libre de recurrencia molecular fue del 43% a 6 meses y del 38% a 60 meses[7]. Desde la publicación de los primeros datos, numerosos estudios han demostrado la factibilidad de esta estrategia. Una de las modificaciones clave en el diseño de ensayos y en las estrategias de la vida real en discontinuación ha sido el cambio del criterio para la reintroducción del tratamiento, que pasó de ser la positivización de la RT-PCR en el *STIM1* a la pérdida de la respuesta molecular mayor (RMM) también tras los datos del grupo francés en el estudio *A-STIM*[8]. A continuación, revisaremos muy brevemente los principales resultados, los retos y las nuevas estrategias terapéuticas en este terreno.

› Ensayos clínicos de discontinuación con imatinib

Los principales resultados de discontinuación tras imatinib se resumen en la Tabla 1[9].

Además de la información generada en ensayos clínicos, se dispone ya de las primeras experiencias publicadas de discontinuación del tratamiento en la práctica clínica habitual. Aquí ha de destacarse la experiencia del Grupo Español de LMC (GELMC), que se comunicó en el Congreso de la American Society of Hematology (ASH) de 2018 y fue publicada igualmente a finales de 2018[10]. En este trabajo, liderado por el Dr. Hernández-Boluda, 236 pacientes de 33 centros que suspendieron el tratamiento con ITC fueron evaluados con un seguimiento medio de 21,5 meses. Las principales razones para discontinuar fueron el intento de suspensión sin toxicidad aparente (70%), la toxicidad de bajo grado (28%) o el embarazo (2%). La mayoría de los pacientes estaba recibiendo imatinib en el momento de la suspensión (74%). El tiempo medio desde el diagnóstico hasta la discontinuación fue de 130 meses. La tasa de supervivencia libre de tratamiento (SLT) a 4 años fue del 64% y la incidencia acumulada de recurrencia molecular fue del 33% a 3 años. La mayoría de los pacientes que precisaron reiniciar el tratamiento se encontraban en respuesta molecular profunda en el último control (89%).

› Ensayos clínicos de discontinuación con inhibidores de segunda generación

Los principales estudios de discontinuación tras tratamiento con ITC de segunda generación se indican en la Tabla 2[9].

Tabla 1. Principales resultados de discontinuación tras imatinib

Estudio	Pacientes	Tratamiento	Respuesta previa requerida	Umbral reinicio ITC	Mediana terapia previa	Remisión libre de tratamiento
STIM1	100	1.ª línea (o tras IFN)	> RM4,5 (indetectable al menos 2 años)	Pérdida de RMC o aumento > 1 log	> 3 años	39% a 77 meses
TWISTER	40	1.ª línea (o tras IFN)	RM4,5 (indetectable al menos 2 años)	Pérdida confirmada de RM 4,5 o RMM	> 3 años	43% a 24 meses
A-STIM	80	1.ª línea (o tras IFN)	RM4,5 al menos 2 años	Pérdida de RMM	> 3 años	61% a 36 meses
KIDS	90	1.ª línea (o tras IFN)	RM4,5 (indetectable al menos 2 años)	Pérdida de RMM	> 3 años	58% a 24 meses
ISAV	108	1.ª línea (o tras IFN)	RM4,0 o RM4,5 (indetectable al menos 18 meses)	Pérdida de RMM	> 3 años	51% a 45 meses
STIM2	124	1.ª línea	> RM4,5 (indetectable al menos 2 años)	Pérdida de RMM o > 1 log de PCR en un punto	> 3 años	61% a 1 año
STIM213	77	1.ª línea (o tras IFN)	RM4,0 durante 2 años confirmado en 4 test	Pérdida de RMM	> 3 años	68% a 1 año
EURO-SKI	750	1.ª línea (o tras IFN)	RM4,0 al menos 1 año	Pérdida de RMM	> 3 años	50% a 36 meses

IFN: interferón; ITC: inhibidores de la tirosina cinasa; RMC: respuesta molecular completa; RMM: respuesta molecular mayor

Tabla 2. Principales estudios de discontinuación tras tratamiento con inhibidores de la tirosina cinasa (ITC) de segunda generación

Estudio	Pacientes	Tratamiento	Respuesta previa requerida	Umbral reinicio ITC	Mediana terapia previa	Remisión libre de tratamiento
STOP 2G TKI	60	Nilotinib o dasatinib	> RM4,5 (indetectable al menos 2 años)	Pérdida de RMM	> 3 años tras resistencia/ intolerancia a imatinib	63% a 1 año
DADI	63	Dasatinib 2.ª línea	Ratio < 0,0069% al menos 1 año	Pérdida de RM4	> 3 años	48% a 1 año
D-STOP	65	Dasatinib (consolidación 2 años)	RM4,0 al menos 2 años	Pérdida confirmada de RMM	> 3 años	63% a 1 año
DASFree	90	Dasatinib 1.ª o 2.ª línea	RM4,5 (indetectable al menos 1 año)	Pérdida de RMM	> 2 años	63% a 1 año
ENESTFreedom	190	Nilotinib 1.ª línea	RM4,5 (indetectable al menos 2 años)	Pérdida de RMM	> 2 años	49% a 96 semanas
ENESTop	126	Nilotinib 2.ª línea	RM4,5 (indetectable al menos 2 años)	Pérdida de RM4,0 o pérdida confirmada RM3	> 2 años	53% a 96 semanas

RMM: respuesta molecular mayor

› Ensayos clínicos de segundo intento de discontinuación y otras estrategias para alcanzar una remisión libre de tratamiento (RLT)

Para los pacientes que pierden la RLT es clave conocer las probabilidades de un segundo intento de discontinuación tras un periodo más o menos prolongado de retratamiento con el mismo ITC (es la estrategia habitual) o con otro fármaco del grupo. El primer estudio con un amplio número de pacientes que ha evaluado esta circunstancia ha sido nuevamente del grupo francés. El ensayo *RE-STIM* incluyó a 70 pacientes que

realizaron un segundo intento de discontinuación tras un primero que fue fallido[11]. La RLT a 12 meses fue del 48% y a 3 años del 35%. Sin embargo, la RLT fue del 72% tras el segundo intento en aquellos pacientes que permanecieron en respuesta profunda durante más de 3 meses tras el primer intento de discontinuación[11]. En la actualidad se están desarrollando diversos ensayos clínicos de segundo intento de discontinuación que pasan por modificar el tratamiento previo al segundo intento con nilotinib (ensayos *NAUT*, *NILO-POST-STIM*), dasatinib (*DASTOP-2*) o diversas combinaciones con fármacos activos frente a la célula *stem* leucémica, como por ejemplo pioglitazona + ITC (*PIO2STOP*), entre otros.

Otra estrategia que se ha evaluado para aumentar la tasa de enfermos que se mantienen en RLT tras suspender el ITC es la reducción o desescalado de dosis, que permite seleccionar a pacientes con mayor probabilidad de discontinuación exitosa. Esta estrategia se ha empleado en el estudio *DESTINY*, que ha sido recientemente publicado[12]. En este ensayo, 174 pacientes que habían sido tratados al menos 3 años con ITC y que habían alcanzado RMM o RM4,0 fueron incluidos. Durante el primer año se redujo a la mitad la dosis del ITC y en los 24 meses siguientes se suspendió el tratamiento. Los pacientes que perdían la respuesta abandonaban el estudio y reiniciaban el tratamiento a la dosis completa previa. En el grupo de RM4,0 el 67% de los pacientes completó los 36 meses y la tasa de supervivencia libre de recaída molecular fue del 72%. En el grupo de RMM solo un 33% completó el estudio y la tasa de supervivencia libre de recaída fue del 36%.

› Necesidad de pruebas biológicas predictoras de la probabilidad de alcanzar una remisión libre de tratamiento

A pesar de que en la mayoría de los estudios publicados coinciden en la importancia de alcanzar una respuesta molecular profunda y el tiempo en que esta se mantiene como uno de los factores clave para predecir una RLT tras la discontinuación del tratamiento, esto no se cumple en todos los casos. Las técnicas moleculares más sensibles, como la PCR digital o la PCR de ADN específica se están evaluando[13,14].

Igualmente, algunos grupos han observado la importancia del estudio del sistema inmune en el momento previo a la discontinuación, especialmente el número y la función de las células NK y otros subtipos de linfocitos, que pueden influir en la RLT[15-17].

Finalmente, el GELMC está estudiando el papel de la determinación de células *stem* leucémicas en médula ósea en este contexto dentro de algunos estudios como el *ENESTPath*, aunque no se dispone de información sobre predicción de RLT por ahora.

› Conclusiones

La discontinuación del tratamiento sigue siendo una de las áreas de mayor interés actual en la LMC. Las nuevas estrategias de discontinuación pasan por la administración de fármacos más potentes en primera línea y/o el cambio a estos previo a la discontinuación. La reducción de dosis permite seleccionar también a pacientes con mayores probabilidades de éxito tras la suspensión definitiva. En cuanto a un segundo intento de discontinuación, el interés está centrado en el retratamiento con fármacos diferentes y más potentes, o las combinaciones de ITC con fármacos que actúan sobre las células *stem* leucémicas.

› Bibliografía

1. Shah NP. NCCN Guidelines Updates: Discontinuing TKI Therapy in the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia. J Natl Compr Canc Netw. 2019;17:611-3.
2. Zhang H, Li S. Molecular mechanisms for survival regulation of chronic myeloid leukemia stem cells. Protein Cell. 2013;4:186-96.
3. Breccia M, Efficace F, Alimena G. Imatinib treatment in chronic myelogenous leukemia: What have we learned so far? Cancer Lett. 2011;300:115-21.
4. Breccia M, Alimena G. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitors and new approaches to target leukemic stem cells: treatment-free remission as a new goal in chronic myeloid leukemia. Cancer Lett. 2014;347:22-8.
5. Mauro MJ. Striving to achieve safe, permanent treatment discontinuation in chronic myeloid leukemia. Leuk Res. 2013;37:1395-403.
6. Mahon FX, Rea D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, et al.; Intergroupe Français des Leucémies Myéloïdes Chroniques. 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.
7. Etienne G, Guilhot J, Rea D, Rigal-Huguet F, Nicolini F, Charbonnier A, et al. Long-Term Follow-Up of the French Stop Imatinib (STIM1) Study in Patients With Chronic Myeloid Leukemia. J Clin Oncol. 2017 Jan 20;35(3):298-305.
8. Rousselot P, Charbonnier A, Cony-Makhoul P, Agape P, Nicolini FE, Varet B, et al. Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine

kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease. J Clin Oncol. 2014 Feb 10;32(5):424-30.

9. Breccia M, Foà R. Current Information and Recommendations on the Discontinuation of TKI Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. Curr Oncol Rep. 2018;20:23.
10. 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: results from a nationwide series of 236 patients. Blood Cancer J. 2018 Dec 2;8(10):91.
11. Legros L, Nicolini FE, Etienne G, Rousselot P, Rea D, Giraudier S, et al.; French Intergroup for Chronic Myeloid Leukemias. Second tyrosine kinase inhibitor discontinuation attempt in patients with chronic myeloid leukemia. Cancer. 2017 Nov 15;123(22):4403-10.
12. Clark RE, Polydoros F, Apperley JF, Milojkovic D, Rothwell K, Pocock C, et al. De-escalation of tyrosine kinase inhibitor therapy before complete treatment discontinuation in patients with chronic myeloid leukaemia (DESTINY): a non-randomised, phase 2 trial. Lancet Haematol. 2019 Jul;6(7):e375-e383.
13. Bernardi S, Malagola M, Zanaglio C, Polverelli N, Dereli Eke E, D'Adda M, et al. Digital PCR improves the quantitation of DMR and the selection of CML candidates to TKIs discontinuation. Cancer Med. 2019 May;8(5):2041-55.
14. Ross DM, Pagani IS, Shanmuganathan N, Kok CH, Seymour JF, Mills AK, et al. Long-term treatment-free remission of chronic myeloid leukemia with falling levels of residual leukemic cells. Leukemia. 2018 Dec;32(12):2572-9.
15. Ilander M, Olsson-Strömberg U, Schlums H, Guilhot J, Brück O, Lähteenmäki H, et al. Increased proportion of mature NK cells is associated with successful imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2017 May;31(5):1108-16.
16. Dumas PY, Bérard E, Bréal C, Dulucq S, Réa D, Nicolini F, et al.; French Intergroup in Chronic Myeloid Leukemia. Killer immunoglobulin-like receptor genotypes and chronic myeloid leukemia outcomes after imatinib cessation for treatment-free remission. Cancer Med. 2019 Sep;8(11):4976-85.
17. Cayssials E, Jacomet F, Piccirilli N, Lefèvre L, Roy L, Guilhot F, et al. Sustained treatment-free remission in chronic myeloid leukaemia is associated with an increased frequency of innate CD8(+) T-cells. Br J Haematol. 2019 Jul;186(1):54-9.

Las nuevas recomendaciones de la Red Europea de Leucemia sobre el diagnóstico, el seguimiento, la evaluación y el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (ELN2019)

Juan Luis Steegmann Olmedillas
Servicio de Hematología y Grupo de Terapias Avanzadas en Oncohematología, Instituto de Investigación Sanitaria (IIS-IP), Hospital Universitario de la Princesa, Madrid

En el momento de redactar estas líneas, ya avanzado el verano de 2019, las guías de la European Leukemia Net (ELN) sobre el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC) no han visto aún la luz, pero los miembros del panel estamos trabajando para que estén listas para octubre de 2019. Espero poder bosquejarlas en el simposio del que son precursoras estas líneas.

Lo primero que los hematólogos se pueden preguntar es: ¿por qué se ha tardado tanto en hacerlas? ¡Llevamos sin ellas desde 2013!, dicen.

Pues bien, creo que la razón fundamental ha sido la de esperar a que los estudios de discontinuación fuesen publicados.

La historia del tratamiento de la LMC es una de éxito. La terapia con imatinib, un inhibidor de la tirosina cinasa (ITK) BCR-ABL, inauguró la era de la terapia de precisión[1]. Nunca se habían obtenido resultados así en una neoplasia, con ese equilibrio tan bueno entre eficacia y toxicidad[1]. La aplicación de los ITK de forma ordenada, regulada, ha permitido vencer resistencias e intolerancias, de manera que la esperanza de vida de un paciente con LMC es similar a la de una persona de su misma cohorte de edad[2,3]. Pero, además, los estudios de discontinuación programada (DCP) de ITK en pacientes con respuesta molecular profunda (RMPro) prolongada han mostrado que un 50-60% de los pacientes permanecían en RMPro a los 5 años de la discontinuación, lo que hemos llamado remisión libre de tratamiento (RLT)[4-7].

Había que incluir estos datos en las nuevas recomendaciones, sin duda, y hacerse las preguntas pertinentes.

La primera pregunta que el panel ha tenido que afrontar es si la RLT es un objetivo para considerar *ab initio* tras el diagnóstico de LMC. Mi opinión es que sí y estimo que la mayoría de los panelistas estamos de acuerdo, al menos en un grupo de pacientes relativamente jóvenes (auguro que la definición de joven va a ser un poco laxa).

Otra de las preguntas que ha sido muy adecuada es si podemos poner en el mismo cajón a todos los ITK aprobados para primera línea (imatinib, nilotinib, dasatinib, bosutinib o radotinib), ya que la experiencia con los 3 primeros es más sólida. Mi opinión es que no y es posible que en eso las guías de la ELN difieran de las de la National Comprehensive Cancer Network (NCCN), que señalan el uso de los ITK de segunda generación (ITK2G) en primera línea en un para mí llamativo orden alfabético[8].

Y al elegir el ITK habrá lógicamente que estimar el riesgo pronóstico y parece que Sokal y *EUTOS long-term survival* (ELTS) serán los sistemas más adecuados. Considerando esta variable, creo que habrá consenso en utilizar ITK2G desde el inicio en todos los pacientes de riesgo intermedio o alto, salvo que sean muy mayores. La cuestión queda en qué hacer en pacientes de bajo riesgo en los que se quiera obtener RLT.

Pero no solo el riesgo, sino que también las comorbilidades y el perfil de toxicidad serán muy tenidos en cuenta. Es muy posible que nos sigamos apoyando en las recomendaciones de la ELN sobre efectos adversos publicadas en 2016[9].

Las palabras para definir los 3 estratos de respuesta serán las mismas, pero parece lógico que el término fallo (*failure*) solo incluya resistencia, no intolerancia. ¿Será la alarma un criterio de cambio de ITK?: no creo que haya consenso, aunque mi opinión es que sí debiera serlo.

Aunque existe el consenso de que obtener al menos RM1 (BCR-ABL IS ≤ 10%) es predictivo de supervivencia e importante para la DCP y la RLT, hay fuerte discusión sobre si tener un valor mayor del 10% a los 3 meses es signo de fallo.

De lo que no cabe duda es de que las guías de la ELN de 2019 serán más exigentes en cuanto a la res-

puesta y en el periodo de 18-24 meses se variará en un logaritmo decimal los estratos de respuesta. No tener respuesta molecular mayor (RMM) en ese periodo será considerado un fallo, muy probablemente.

Por último, ¿qué tipo de respuesta profunda prolongada será precisa para la DCP? Creo que a la mayoría de los panelistas les parece indiferente el que sea RM4 o mejor, aunque yo no lo crea y me incline por RM4,5 o mejor. Donde no hay mayoría cualificada es en los óptimos tiempos de tratamiento previo y de duración de la RMPro.

En resumen, las nuevas recomendaciones de la ELN en LMC van a tener como novedad principal incluir como objetivo adicional la RLT (lo cual es realmente nuevo) y eso va a conllevar una mayor exigencia en profundidad de respuesta, a la hora de clasificarla, especialmente tras 18 meses de tratamiento.

› Bibliografía

1. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. Nat Med. 1996 May;2(5):561-6.
2. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. Blood. 2013 Aug 8;122(6):872-84.
3. Bower H, Bjorkholm M, Dickman PW, Hoglund M, Lambert PC, Andersson TM. Life Expectancy of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Approaches the Life Expectancy of the General Population. J Clin Oncol. 2016 Aug 20;34(24):2851-7.
4. Mahon FX, Rea 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.
5. Giles FJ, Rosti G, Beris P, Clark RE, le Coutre P, Mahon FX, et al. Nilotinib is superior to imatinib as first-line therapy of chronic myeloid leukemia: the ENESTnd study. Expert Rev Hematol. 2010 Dec;3(6):665-73.
6. Hochhaus A, Rosti G, Cross NC, Steegmann JL, le Coutre P, Ossenkoppele G, et al. Frontline nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from the European ENEST1st study. Leukemia. 2016 Jan;30(1):57-64.
7. 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: results from a nationwide series of 236 patients. Blood Cancer J. 2018 Dec 2;8(10):91.
8. NCCN. NCCN Guidelines Chronic Myelogenous leukemia, version 1-2019. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology 2019. Disponible en: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cml_blocks.pdf.
9. Steegmann JL, Baccarani M, Breccia M, Casado LF, García-Gutiérrez V, Hochhaus A, et al. European Leukemia Net recommendations for the management and avoidance of adverse events of treatment in chronic myeloid leukaemia. Leukemia. 2016 Aug;30(8):1648-71.

24 - 26 octubre
2019
www.sehhseth.es
Valencia
1959 - 2019
SEHH
60 años
SETH
LXI Congreso Nacional de la SEHH
XXXV Congreso Nacional de la SETH

24 - 26 octubre

www.sehhseth.es

2019

Valencia

1959 - 2019 SEHH 60 años

SETH

LXI Congreso Nacional de la SEHH

XXXV Congreso Nacional de la SETH