

## EDITORIAL

- 43 **¿Por qué los médicos seguimos haciendo cosas innecesarias?: algunas reflexiones con sesgo hematológico**  
*Guillermo J. Ruiz-Argüelles*

## ARTÍCULOS ORIGINALES

- 45 **Metabolismo del hierro, mutaciones en H63D y hemocromatosis hereditaria en pacientes con anemia drepanocítica en la India**  
*Sanjay Pandey, Sweta Pandey, Vineet Shah, Rahasya Mani Mishra, Tulika Seath, Renu Saxena*
- 49 **Implante de células mononucleares autólogas no manipuladas de médula ósea en insuficiencia cardíaca por enfermedad coronaria crónica**  
*Óscar González-Ramella, Sergio Najar, Silvio Cuneo-Pareto, Edgardo Flores, Karlen Gazarian, Antonio Carrasco-Yalan*
- 58 **Neutropenia congénita asociada con estrabismo y nistagmus: nuevo síndrome ligado al cromosoma X. Estudio de una familia**  
*Carlos S. Ron-Guerrero*

## ARTÍCULOS DE REVISIÓN

- 65 **El papel de la nucleofosmina (NPM1) en las neoplasias malignas mieloides**  
*Nélida Inés Noguera, Eduardo Garza de la Peña, Francesco Lo-Coco*
- 74 **Utilidad del trasplante de células hematopoyéticas en la leucemia mieloide aguda**  
*David Gómez-Almaguer, Juan Antonio Flores-Jiménez, Olga Cantú-Rodríguez, César Homero Gutiérrez-Aguirre*

## CASO CLÍNICO

- 80 **Trasplante de médula ósea exitoso en una paciente testigo de Jehová**  
*María José Benzo-Hernández, Nancy Alam, Sócrates Sosa, Gladys Paulino*

# Revista de Hematología

Volumen 13, abril-junio, 2012

## EDITOR

Guillermo J. RUIZ-ARGÜELLES. Puebla, México

## COMITÉ EDITORIAL

Álvaro AGUAYO. Ciudad de México, México

Javier BOLAÑOS-MEADE. Baltimore, EUA

Jorge CORTÉS. Houston, EUA

Aurora DE-LA-PEÑA. Ciudad de México, México

Sergio GIRALT. Nueva York, EUA

David GÓMEZ-ALMAGUER. Monterrey, México

Renán A. GÓNGORA-BIACHI. Mérida, México

Bertha IBARRA. Guadalajara, México

José Carlos JAIME-PÉREZ. Monterrey, México

Francesco Lo COCO. Roma, Italia

Xavier LÓPEZ-KARPOVITCH. Ciudad de México, México

Alejandro MADRIGAL. Londres, Inglaterra

Carlos MARTÍNEZ-MURILLO. Ciudad de México, México

Héctor MAYANI. Ciudad de México, México

Rubén A. MESA. Scottsdale, EUA

José María MORALEDA. Murcia, España

Rubén NIESVIZKY. Nueva York, EUA

Guillermo J. RUIZ-DELGADO. Puebla, México

Arlette RUIZ-de-SAEZ, Caracas, Venezuela

Jesús F. SAN-MIGUEL. Salamanca, España

Luz del Carmen TARIN-ARZAGA. Monterrey, México

Enrique TORRE-LÓPEZ. San Luis Potosí, México

José Francisco TOMAS. Madrid, España

Jorge VELA-OJEDA. Ciudad de México, México

Luis A. VILLELA. Monterrey, México

## PRESIDENTE

Carlos MARTÍNEZ-MURILLO

## VICEPRESIDENTE

Xavier LÓPEZ-KARPOVITCH

## SECRETARIA

Aurora DE-LA-PEÑA-DÍAZ

## TESORERA

Adolfina BERGES-GARCÍA

## VOCAL DE ACTIVIDADES CIENTÍFICAS

Gabriela CESARMAN-MAUS

## VOCAL DE ADMISIÓN

Ignacio AGUIRRE-AGUIRRE

**Revista de Hematología** es una publicación trimestral, órgano oficial de la Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología, AC, calle San Francisco 1626-406, colonia Del Valle, México 03100, DF. Teléfono: (55) 55 241112. sitio web: <http://amehac.org>. Registros de título y licitud de contenido, en trámite. Editada, producida y comercializada por: Edición y Farmacia, SA de CV (Grupo Nieto Editores), Calle José Martí Núm. 55, colonia Escandón, México 11800, DF. Teléfono: (55) 56782811. [www.nietoeditores.com.mx](http://www.nietoeditores.com.mx). Ventas: Georgina González T y Alejandra Nieto S. Diseño y formación: Elidé Morales R. Toda la correspondencia relacionada con el contenido editorial debe dirigirse al editor: Dr. Guillermo J RUIZ-ARGÜELLES, 8B Sur 3710 - Puebla 72530, Pue. Correo electrónico: [gruiz1@clinicaruiz.com](mailto:gruiz1@clinicaruiz.com). Impresa en México.

## CONTENIDO

### EDITORIAL

- 43 ¿Por qué los médicos seguimos haciendo cosas innecesarias?: algunas reflexiones con sesgo hematológico  
*Guillermo J. Ruiz-Argüelles*

### ARTÍCULOS ORIGINALES

- 45 Metabolismo del hierro, mutaciones en H63D y hemocromatosis hereditaria en pacientes con anemia drepanocítica en la India  
*Sanjay Pandey, Sweta Pandey, Vineet Shah, Rahasya Mani Mishra, Tulika Seath, Renu Saxena*
- 49 Implante de células mononucleares autólogas no manipuladas de médula ósea en insuficiencia cardíaca por enfermedad coronaria crónica  
*Óscar González-Ramella, Sergio Najjar, Silvio Cuneo-Pareto, Edgardo Flores, Karlen Gazarian, Antonio Carrasco-Yalan*
- 58 Neutropenia congénita asociada con estrabismo y nistagmus: nuevo síndrome ligado al cromosoma X. Estudio de una familia  
*Carlos S. Ron-Guerrero*

### ARTÍCULOS DE REVISIÓN

- 65 El papel de la nucleofosmina (NPM1) en las neoplasias malignas mieloides  
*Nélida Inés Noguera, Eduardo Garza de la Peña, Francesco Lo-Coco*
- 74 Utilidad del trasplante de células hematopoyéticas en la leucemia mieloide aguda  
*David Gómez-Almaguer, Juan Antonio Flores-Jiménez, Olga Cantú-Rodríguez, César Homero Gutiérrez-Aguirre*

### CASO CLÍNICO

- 80 Trasplante de médula ósea exitoso en una paciente testigo de Jehová  
*María José Benzo-Hernández, Nancy Alam, Sócrates Sosa, Gladys Paulino*

## CONTENTS

### EDITORIAL

- 43 Why Do We Physicians Keep Doing Unnecessary Things? Some Reflexions From the Point of View of Hematology  
*Guillermo J. Ruiz-Argüelles*

### ORIGINAL ARTICLES

- 45 H63D Hereditary hemochromatosis and iron metabolism in indian sickle cell patients  
*Sanjay Pandey, Sweta Pandey, Vineet Shah, Rahasya Mani Mishra, Tulika Seath, Renu Saxena*
- 49 Non-Manipulated Autologous Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells Implant in Cases of Resistant Chronic Heart Failure  
*Óscar González-Ramella, Sergio Najjar, Silvio Cuneo-Pareto, Edgardo Flores, Karlen Gazarian, Antonio Carrasco-Yalan*
- 58 Association Between Congenital Neutropenia and Strabismus and Nystagmus: A New X Chromosome-Linked Syndrome. Study of a Family  
*Carlos S. Ron-Guerrero*

### REVIEW ARTICLES

- 65 The Role of Nucleophosmin (NPM1) in Myeloid Malignancies  
*Nélida Inés Noguera, Eduardo Garza de la Peña, Francesco Lo-Coco*
- 74 Advantages of Hematopoietic Cells Transplant in Cases of Acute Myeloid Leukaemia  
*David Gómez-Almaguer, Juan Antonio Flores-Jiménez, Olga Cantú-Rodríguez, César Homero Gutiérrez-Aguirre*

### CLINICAL CASE

- 80 Successful Bone Marrow Transplant in a Jehova's Witness  
*María José Benzo-Hernández, Nancy Alam, Sócrates Sosa, Gladys Paulino*

## ¿Por qué los médicos seguimos haciendo cosas innecesarias?: algunas reflexiones con sesgo hematológico

Guillermo J Ruiz-Argüelles\*

Un buen número de las acciones que los médicos emprendemos de manera cotidiana son innecesarias o indebidas y, sin embargo, las continuamos haciendo. He aquí algunos ejemplos:

1. La administración de bloqueadores beta adrenérgicos a pacientes con infarto de miocardio no sólo no los beneficia, sino los perjudica y... lo seguimos haciendo.
2. Ningún tratamiento es útil para disminuir o eliminar la tos y... seguimos recetando jarabes.
3. Los pacientes con bronquitis, sinusitis o faringitis empeoran con los antibióticos y... se los seguimos recomendando, propiciando, además, la resistencia bacteriana.
4. Los dolores de espalda baja no desaparecen con cirugía y las operaciones... se siguen indicando.
5. Las cirugías artroscópicas de rodilla no son mejores que las "operaciones placebo" y... se siguen llevando a cabo.
6. Las "reacciones febriles" no tienen utilidad alguna y... muchos médicos las siguen solicitando.

En el caso específico de la hematología, hay también varias acciones innecesarias que seguimos llevando a cabo y sobre las que deberíamos reflexionar:

\* Laboratorios Clínicos de Puebla. Clínica Ruiz. Puebla, Pue, México.

Correspondencia: Dr. Guillermo J. Ruiz-Argüelles. Centro de Hematología y Medicina Interna. Clínica Ruiz. 8B Sur 3710, Puebla 72530, Pue. México. Correo electrónico: gruz1@clinaruiz.com

Este artículo debe citarse como: Ruiz-Argüelles GJ. ¿Por qué los médicos seguimos haciendo cosas innecesarias?: algunas reflexiones con sesgo hematológico. Rev Hematol Mex 2012;13(2):43-44.

[www.nietoeditores.com.mx](http://www.nietoeditores.com.mx)

1. Se hacen aspirados de médula ósea innecesarios a pacientes con leucemia aguda con grandes concentraciones de leucocitosis y blastos en sangre periférica.
2. Se aspira innecesariamente la médula ósea para diagnosticar leucemias granulocítica o linfocítica crónicas.
3. Indebidamente se aspira la médula ósea para seguir la enfermedad residual de pacientes con leucemia granulocítica crónica.
4. Se hacen biopsias de hueso bilaterales innecesarias en pacientes con linfoma de Hodgkin en estadios clínicos iniciales.
5. Innecesariamente se hacen estudios de biología molecular en la médula ósea y no en sangre periférica en pacientes con leucemias agudas o crónicas.
6. Se prescriben de manera rutinaria anticonvulsivos a pacientes trasplantados de médula ósea y acondicionados con busulfán.
7. Indebidamente se solicita proteinuria de Bence Jones para estudiar a pacientes con mieloma múltiple, a pesar del gran número de resultados falsos positivos y negativos de esta prueba arcaica.
8. Se sigue solicitando la cuantificación de las inmunoglobulinas en pacientes con mieloma múltiple a pesar de que es claro que la paraproteinemia debe vigilarse con electroforesis de proteínas.
9. En deficiencia de hierro se sigue prescribiendo tratamiento con hierro polimaltosado cuando se ha demostrado que esta sal no se absorbe adecuadamente del tubo digestivo.
10. Se siguen estableciendo diagnósticos de hipoplasia medular (anemia aplásica) en aspirados de médula ósea cuando es claro que sólo puede establecerse y cuantificarse por medio de la biopsia de hueso.

Terminar con conductas ancestrales y equivocadas no siempre es fácil en medicina; la hematología no es la excepción. Sólo la actualización continua de los conocimientos por medio del estudio ininterrumpido permitirá eliminar algunas conductas indebidas de nosotros los hematólogos que en algunos casos no sólo son inadecuadas, sino hasta peligrosas. En muchas ocasiones, romper dogmas es lo que permite el avance de los conocimientos médicos.

---

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Newman, DH. Believing in treatments that don't work. The New York Times 2 April 2009; en <http://well.blogs.nytimes.com/2009/04/02/the-ideology-of-health-care/>
2. Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Almaguer D, Steensma D. Outdated dogma? Busulfan, seizure prophylaxis, and stem cell allografting. *Am J Hematal* 2012. In the press
3. Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles GJ, López-Martínez B, Estrada E, et al. Role of bone marrow examination in staging Hodgkin's disease: Experience in México. *Clin Lab Haematol* 2002; 24:221-223.
4. Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Reyes-Núñez V, Pérez-Romano B, Ruiz-Argüelles A, et al. Assessment of residual disease in acute leukemia by means of polymerase chain reaction: A prospective study in a single institution. *Rev Invest Clín Méx* 2000;52:118-124.
5. Ruiz-Argüelles GJ, Fernández-Lara D, Estrada-Gómez R, Manzano C, Ruiz-Delgado GJ, et al. Minimal residual disease testing in acute leukemia by flow cytometry immunophenotyping: Prognostic significance. *Lab Hematol* 2007;13:22-26.
6. Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Ruiz-Argüelles A. Molecular follow-up of patients with promyelocytic leukaemia treated with all trans-retinoic acid. *Clin Lab Haematol* 1998;20:173-176.
7. Ruiz-Argüelles GJ, Díaz-Hernández A, Manzano C, Ruiz-Delgado GJ. Ineffectiveness of oral iron hydroxide polymaltose in iron-deficiency anemia. *Hematology* 2007;12:255-256.
8. Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Almaguer D. Breaking dogmata to help patients: Non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:1693-1699.

## Metabolismo del hierro, mutaciones H63D y hemocromatosis hereditaria en pacientes con anemia drepanocítica en la India

### H63D hereditary hemochromatosis and iron metabolism in Indian sickle cell patients

Sanjay Pandey,\* Sweta Pandey,\*\* Vineet Shah,\*\* Rahasya Mani Mishra,\*\*\* Tulika Seath,\* Renu Saxena\*

#### RESUMEN

**Antecedentes:** la hemocromatosis hereditaria es un trastorno del metabolismo del hierro caracterizado por aumento en su absorción y almacenamiento. La mutación H63D del gen HFE puede estar asociada con sobrecarga de hierro en pacientes hindúes con anemia de células falciformes (drepanocítica).

**Objetivo:** determinar la prevalencia de mutaciones H63D y su efecto en pacientes hindúes con anemia drepanocítica.

**Material y método:** los sujetos de estudio fueron pacientes con drepanocitosis (50 con hemoglobinopatía S homocigota y 67 con hemoglobina S /  $\beta$ -talasemia). Se incluyeron también 178 controles sanos apareados por sexo y edad. Se realizó conteo celular completo mediante un analizador celular automatizado y medición cuantitativa de hemoglobina por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se extrajo ADN de leucocitos de sangre periférica con el método fenol-cloroformo. La mutación de H63D fue determinada por PCR-RFLP y los productos del PCR fueron digeridos por restricción de la enzima Bcl-1. Los estudios del hierro fueron realizados por un método estándar de laboratorio. El análisis estadístico se realizó con el software Epi-Info. Se utilizó la prueba de la  $\chi^2$  de Yates para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos de estudio y la t de Student para comparar las medias aritméticas, mediante el software GraphPad.

**Resultados:** la prevalencia de H63D fue significativamente mayor en el grupo de enfermos (28%) que en los controles (10%) (valor de  $p \pm 0.004$  y  $\pm 0.057$ ). El hierro sérico fue mayor en el grupo con mutación H63D que en el que no la padecía (valor de  $p < 0.001$ ).

**Conclusión:** la mutación H63D se relaciona significativamente con aumento de la absorción y metabolismo bajo del hierro en pacientes hindúes con células falciformes.

**Palabras clave:** HFE, SCD, H63D, hemocromatosis

#### ABSTRACT

**Background:** Hereditary hemochromatosis is an iron metabolism disorder characterized by increased iron absorption and storage. H63D mutation of HFE gene may be associated with iron overload in Indian sickle cell patients.

**Objective:** determine the prevalence of the H63D mutations and their effect on iron metabolism in Indian sickle cell patients.

**Material and Method:** Study subjects were sickle cell patients (50 sickle cell anemia and 67 sickle  $\beta$ -thalassemia). One hundred seventy, age and sex matched healthy controls were recruited to compare the frequency of H63D mutation. Complete blood count was measured by automated cell analyzer and quantitative assessment of hemoglobin was performed by high performance liquid chromatography. DNA was extracted from the peripheral blood leucocytes by phenol-chloroform method. HFE gene mutations H63D was determined by PCR-RFLP and PCR products were digested with restriction enzymes Bcl-1. Iron studies were done by standard laboratory method. Statistical analysis was performed on EpiInfo statistics software. Yates' chi-square test was used to assess inter-group significance and t-test used to compare the means of two groups on GraphPad software.

**Result:** The prevalence of HFE mutation H63D was investigated among 50 sickle cell anemia and 67 sickle  $\beta$ -thalassemia patients. The prevalence of H63D was statistically significant in the group ( $p$ -value,  $\pm 0.004$  and  $\pm 0.057$ ). Serum iron in the H63D group were higher in comparison to without H63D group of patients ( $p$ -value  $< 0.001$ ).

**Conclusion:** H63D mutation present significantly and associated with increased iron absorption and low iron metabolism in Indian sickle cell patients.

**Key words:** HFE, SCD, H63D, Hemochromatosis

\* Department of Hematology, All India Institute of Medical Sciences, New Delhi, India.

\*\* Department of Cardiac Biochemistry, All India Institute of Medical Science, New Delhi, India.

\*\*\* Department of Environmental biology, Awadhesh Pratap Singh University, Rewa, India.

110 029, India. E-mail: pandeysanjaybt@rediffmail.com  
Received: March 2012. Accepted: May 2012

This article should be cited as: Pandey S, Pandey SW, Shah V, Mishra RM, Seath T, Saxena R. H63D hereditary hemochromatosis and iron metabolism in Indian sickle cell patient. Rev Hematol Mex 2012;13(2):45-48.

Correspondence: Sanjay Pandey. Department of Hematology, All India Institute of Medical Sciences, Ansari Nagar, New Delhi

[www.nietoeditores.com.mx](http://www.nietoeditores.com.mx)



**H**ereditary hemochromatosis is a common autosomal recessive disorder of iron metabolism in Caucasians, with a prevalence of one in 300-500 individuals. Iron homeostasis is maintained by regulating iron absorption. Unlike for other essential minerals, the human body does not have a regulatory mechanism for excreting excess iron. In Mediterranean countries the most common cause of iron overload is homozygous  $\beta$ -thalassemia.<sup>1</sup> Hereditary hemochromatosis is an iron metabolism disorder characterized by increased iron absorption and storage, resulting in progressive and multisystemic oxidative organ damage. In 1996, the HFE gene was identified on candidate for the gene bearing the primary defect responsible for hemochromatosis.<sup>2-4</sup> Genetic factors and acquired conditions are likely to modulate the expression of HFE hemochromatosis.

Two missense mutations (C282Y, H63D) have been described on the HFE gene in patients suffering from hereditary hemochromatosis on the basis of phenotypic data. H63D is a C-G transition at nucleotide 187 of the HFE gene which results in a histidine to aspartic acid substitution. It has been found to be present with a frequency of 3.3%-15.2% in the general population across the world.<sup>5-7</sup> The H63D mutation has been found to be highly prevalent among Brazilians (carrier frequency: 27.5%), with a frequency similar to what is observed among white Europeans, particularly among Italians.<sup>8,9</sup> There are only a few studies from India on the frequency of the known HFE gene mutations.<sup>10-13</sup> Thus the aim of this study was to determine the prevalence of the H63D mutations and their effect on iron metabolism in Indian sickle cell patients.

## MATERIAL AND METHODS

Study subject were sickle cell patient (50 sickle cell anemia and 67 sickle  $\beta$ -thalassemia) who were attending the outpatient department of hematology. Age –sex matched 170 controls were recruited to compare the frequency of H63D mutation. Screening of the patients was done by cation exchange high performance liquid chromatography (HPLC). About 5 ml venous blood was taken for DNA extraction and iron study; after informed consent from all the patients and controls. Study was approved by institutional ethical committee. Complete blood count and red cell indices were measured by automated cell analyzer

(SYSMEX K-4500, Kobe Japan). Quantitative assessment of hemoglobin Hb F, Hb A, Hb A2 and Hb S was performed by HPLC (Bio-Rad-Variant™ Bio Rad, CA, USA). DNA was extracted from the peripheral blood leucocytes by phenol-chloroform method. HFE gene mutations H63D was determined by specific polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) according to Feder<sup>14</sup> (1996) et.al. The PCR products were digested with restriction enzymes Bcl-1 (New England Bio labs, Beverly, MA) to identify the H63D variants. Serum iron, total iron binding capacity (TIBC) and % transferrin saturation estimation was done by standard laboratory method. Statistical analysis was performed on EpiInfo statistics software (Version 3.5.1). Yates' chi-square test was used to assess inter-group significance and p-value <0.05 was considered statistically significant. *t* test was applied to compare the means of two group on GraphPad (version 3.06) software.

## RESULTS

Sickle cell patients were divided in two groups. First group was had fifty sickle cell anemia and second group was had 67 sickle  $\beta$ -thalassemia patients. One hundred seventy, age and sex matched healthy controls were recruited to compare the frequency of H63D mutation. In group-1; male were 30 (60.0%) and female were 20 (40.0%) with mean age of 10.72±7.68 years. Forty nine (73.1%) male and 18(26.9%) female with mean age group of 11.91±8.30 years, patients were in group-2. In controls; 102 (60.0%) were male and 68(40.0%) were female with mean age of 10.99±7.61 years. Out of the 67 sickle  $\beta$ -thalassemia patients, 13(19.4%) were heterozygous and 7(10.45%) were homozygous for the H63D mutation. In the group of sickle homozygous, nine (18%) were heterozygous and 5(10%) were homozygous. One Hundred seventy controls were had 12 (7.05%) heterozygous and 4(2.35%) homozygous. Serum iron with H63D mutation was high (113.7±20.5 $\mu$ g/dl) in comparison to without H63D patients (94.6±25.3 $\mu$ g/dl). Total iron binding capacity (TIBC) was 315.9±28.3 $\mu$ g/dl in H63D mutant while 327.4±15.7 $\mu$ g/dl was without H63D mutant. Transferrin saturation % was 32.6±7.3% in H63D mutant group and 29.7±5.3% in without H63D mutant group. The frequencies of H63D and iron parameters are given in **table 1 and 2** respectively.

**Table 1.** Frequency of H63D Mutation

Mutation	Genotype	Patients		Control N=170	p-value	OR	95%CI
		HbSS N=50	HbSβthal. N=67				
H63D	-/-	36(72%)	47(70.15%)	154(90.58%)	0.00003	0.25	0.13-0.51
	±	9(18%)	13(19.4%)	12 (7.05%)	0.004	3.05	1.37-6.89
	+/+	5(10%)	7(10.45%)	4(2.35%)	0.057	3.56	0.97-14.12

**Table 2.** Iron, TIBC and Transferrin saturation% levels

Parameters	Sickle patients with H63D N=34	Sickle patients without H63D N=83	P-value
Serum Iron µg/dL	113.7±20.5	94.6±25.3	0.0001
TIBC µg/dl	315.9±28.3	327.4±15.7	0.005
Transferrin saturation %	32.6±7.3	29.7±5.3	0.018

## DISCUSSION

Iron overload can be associated with various pathological conditions.<sup>15</sup> Hereditary hemochromatosis is considered to be the most common inherited disorder in Caucasians and presents a variable prevalence among different ethnic groups.<sup>3,16</sup> Primary iron overloads is uncommonly encountered in Indians and happens to be common in the Caucasians of North Europe. In the west, the C282Y mutation of the HFE gene is associated with Hereditary hemochromatosis in majority of cases. Variations in prevalence of the HFE gene mutations (C282Y and H63D) have been established in many European populations and descent (United States, Canada, Australia and South Africa). Few studies are available from India on the prevalence of these mutations in the general population.<sup>10-13</sup> The prevalence of *hereditary haemochromatosis* seems to be low in people of Asian origin. In our study, sickle homozygous was had 18% H63D heterozygous. The sickle β-thalassemia was had 19.4% heterozygous and controls was had 7.05% heterozygous. Homozygous H63D were 10%, 10.45% and 2.35% in sickle homozygous, sickle β-thalassemia patients and controls respectively. Prevalence of heterozygous and homozygous were statistically significant (p-value +/-0.004 and +/+ 0.057). In Brazil, H63D screening in 4 specific populations (Caucasians, African descendants, Parakana Indians, and a racially mixed group) indicated the H63D mutation varied from 0% in Parakana Indians to 16.3%

in Caucasian descendants.<sup>8</sup> Screening for hemochromatosis mutations in beta-thalassemia minor patients from Iran indicated significant differences in the frequencies of C282Y and H63D mutants in relation to control individuals<sup>17</sup> but these differences were not observed in Portugal and India.<sup>18,19</sup> In a study carried out in Hong Kong, iron overload in alpha-thalassemia was not related to hemochromatosis mutations.<sup>20</sup> Most European studies have reported that 60-90% of typical hemochromatosis patients are homozygous for the C282Y mutation of the HFE gene (C282Y/C282Y). Compound heterozygotes (C282Y/H63D) and, less commonly, H63D homozygotes usually have normal iron tests, but it has been described that in some cases these genotypes may resemble C282Y homozygotes, with mild-to-moderate iron overload.<sup>21-24</sup> In our cases the 56 sickle cell patients were transfusion dependent where 23 patient were H63D mutant either heterozygous or homozygous condition. Serum iron was higher in H63D positive sickle patients group and statistically significant (p-value-0.0001). In conclusion H63D mutation present significantly and associated with increased iron absorption and low iron metabolism in Indian sickle cell patients.

**Acknowledgements:** Sincere thanks to technical staff of department of hematology AIIMS, for expert assistance

**Financial Support:** This study supported by ICMR & Hematology Department AIIMS, New Delhi, India



## REFERENCES

1. Gabutti V, Piga A. Results of long-term iron-chelating therapy. *Acta Haematol* 1996; 95:26-36.
2. Griffiths W, Cox T. Haemochromatosis: novel gene discovery and the molecular pathophysiology of iron metabolism. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2377-2382.
3. Hash RB. Hereditary hemochromatosis. *J Am Board Fam Pract* 2001; 14: 266-273.
4. Swinkels DW, Janssen MC, Bergmans J, Marx JJ. Hereditary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches. *Clin Chem* 2006; 52: 950-968.
5. Barton JC, Shih WW, Sawada-Hirai R, Acton RT, Harmon L, Rivers C, Rothenberg BE. Genetic and clinical description of hemochromatosis probands and heterozygotes: evidence that multiple genes linked to the major histocompatibility complex are responsible for hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis* 1997; 23: 135-145.
6. Beutler E. The significance of the 187G (H63D) mutation in hemochromatosis. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 762-764.
7. Mura C, Raguene O, Ferec C. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood* 1999; 93: 2502-2505.
8. Agostinho MF, Arruda VR, Basseres DS, et al. Mutation analysis of the HFE gene in Brazilian populations. *Blood Cells Mol Dis* 1999; 25(5-6):324-327.
9. Calado RT, Franco RF, Pazin-Filho A, Simões MV, Marin-Neto JA, Zago MA. HFE gene mutations in coronary atherosclerotic disease. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33(3):301-306.
10. Garewal G, Das R, Kaur J, Chawla Y. H63D mutation of the Hfe gene in beta thalassemia traits does not cause iron overload and hereditary haemochromatosis in North India is of the Non-Hfe Type. *Blood* 2002; Abstract No. 3465, 100 (11): 4b.
11. Garewal G, Das R, Ahluwalia J, Marwaha RK. Prevalence of the H63D mutation of the HFE in north India: its presence does not cause iron overload in beta thalassemia trait. *Eur J Haematol* 2005; 74: 333-336.
12. Thakur V, Guptan RC, Hashmi AZ, Sakhuja P, Malhotra V, Sarin SK. Absence of hemochromatosis associated Cys282Tyr HFE gene mutation and low frequency of hemochromatosis phenotype in nonalcoholic chronic liver disease patients in India. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 86-90.
13. Shukla P, Julka S, Bhatia E, Shah S, Nagral A, Aggarwal R. HFE, hepcidin and ferroportin gene mutations are not present in Indian patients with primary haemochromatosis. *Natl Med J India* 2006; 19: 20-23.
14. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996; 13: 399-408.
15. Fleming DJ, Jacques PF, Tucker KL, et al. Iron status of the free-living, elderly Framingham Heart Study cohort: an iron-replete population with a high prevalence of elevated iron stores. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(3):638-646.
16. Brissot P. Hemochromatosis at the intersection of classical medicine and molecular biology. *C R Acad Sci III* 2001; 324: 795-804.
17. Jazayeri M, Bakayev V, Adibi P, Haghighi RF, Zakeri H, Kalantar E, et al. Frequency of HFE gene mutations in Iranian beta-thalassaemia minor patients. *Eur J Haematol* 2003; 71: 408-411.
18. Alexander J, Kowdley KV. Hereditary hemochromatosis: genetics, pathogenesis, and clinical management. *Ann Hepatol* 2005; 4: 240-247.
19. Martins R, Picanco I, Fonseca A, Ferreira L, Rodrigues O, Coelho M, et al. The role of HFE mutations on iron metabolism in betathalassaemia carriers. *J Hum Genet* 2004; 49: 651-55.
20. Chan V, Wong MS, Ooi C, Chen FE, Chim CS, Liang RH, et al. Can defects in transferrin receptor 2 and hereditary hemochromatosis genes account for iron overload in HbH disease? *Blood Cells Mol Dis* 2003; 30:107-111.
21. Powell LW. Hereditary hemochromatosis and iron overload diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17:191-195.
22. Camaschella C, Piperno A. Hereditary hemochromatosis: recent advances in molecular genetics and clinical management. *Haematologica* 1997; 82(1):77-84.
23. Olynyk JK, Cullen DJ, Aquilia S, Rossi E, Summerville L, Powell LW. A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* 1999; 341(10):718-724.
24. Steinberg KK, Cogswell ME, Chang JC, et al. Prevalence of C282Y and H63D mutations in the hemochromatosis (HFE) gene in the United States. *JAMA* 2001; 285(17):2216-2222.

## Implante de células mononucleares autólogas no manipuladas de médula ósea en insuficiencia cardíaca por enfermedad coronaria crónica

Óscar González-Ramella, Sergio Nájar, Silvio Cuneo-Pareto, Edgardo Flores, Karlen Gazarian, Antonio Carrasco Yalan

### RESUMEN

**Antecedentes:** el implante de células mononucleares autólogas no manipuladas de médula ósea por vía arterial o venosa transcoronaria ha demostrado su utilidad clínica en pacientes con enfermedades cardíacas crónicas y agudas. Para asegurar el nidamiento de células y alcanzar áreas ventriculares isquémicas e hipocinéticas se han utilizado diferentes procedimientos.

**Objetivo:** comunicar nuestra experiencia con el uso de células mononucleares autólogas no manipuladas de médula ósea en el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardíaca crónica.

**Material y método:** estudio retrospectivo efectuado en 20 pacientes consecutivos, con mediana de edad de 62 años (límites 34 y 75), a quienes entre los meses de mayo de 2007 y julio de 2009 se hizo implante de células mononucleares no manipuladas de médula ósea por vía coronaria y retrocoronaria a través del seno coronario y sus principales venas. La relación femenino-masculino ratio 3/17; 95% de los pacientes tenían clase funcional NYHA entre II y III, con tres pacientes en NYHA IV. Ninguno de los pacientes eran aptos para cirugía de revascularización ni angioplastia. La fracción basal de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) fue 24.4% (límites 12 y 39). Después de firmar el consentimiento informado se les extrajo una mediana de volumen de 564 mL (límites 248-950) de médula ósea obtenida mediante punción iliaca. El leuco concentrado se realizó mediante el uso de HES al 6% y con centrifugación refrigerada en condiciones estériles. El concentrado de células mononucleares se implantó mediante coronariografía del seno venoso y arterias coronarias seleccionadas con oclusión previa de un catéter balón "over wire". La mediana de células mononucleares y CD34+ infundidas fue:  $1.6 \times 10^9$  y  $2.21 \times 10^7$ , respectivamente.

**Resultados:** durante y después del procedimiento no se observaron arritmias ni incremento de enzimas cardíacas o cambios hemodinámicos. Después de la mediana de tiempo de 20.1 meses, las células mononucleares autólogas no manipuladas de médula ósea produjeron la mejoría de la clase funcional NYHA. La mediana de la FEVI mejoró significativamente a 35.1% ( $p=0.003$ ). Entre los 18 pacientes evaluables, 13 (72%) redujeron, al menos, una clase funcional NYHA y cuatro permanecieron en la misma clase funcional NYHA, sólo un paciente incrementó de clase NYHA. No se encontró correlación entre cantidad de grupos celulares y mejoría del NYHA o de la FEVI.

**Conclusiones:** el implante de células mononucleares autólogas no manipuladas de médula ósea a pacientes con insuficiencia cardíaca es posible y seguro porque permite la infusión de grandes cantidades de células a los vasos coronarios pobremente irrigados. Este estudio sugiere la potencial disminución de los signos y síntomas y la mejoría en la capacidad funcional, perfusión miocárdica y contractibilidad mediante el implante de células mononucleares autólogas de médula ósea en pacientes con insuficiencia cardíaca.

**Palabras clave:** terapia celular, insuficiencia cardíaca, CD34, médula ósea.

### ABSTRACT

**Background:** Transcoronary unselected autologous bone marrow mononuclear cells (ABMMC) implant through coronary arteries or veins had shown clinical benefit in patients with acute and chronic heart diseases. Different procedures had been used to assure and improve cell homing and reach ischemic and hypokinetic ventricular areas.

**Objective:** Herein we show our outcomes using ABMMC in chronic heart failure (CHF)

**Material and method:** During May 2007 to July 2009, 20 consecutive patients, median age 62 years old (range 34-75), female/male ratio 3/17; 95% of the patients had II to III NYHA class with three patients with IV NYHA class. None of these patient were candidates for myocardial revascularization surgery neither angioplasty. Basal left ventricular ejection fraction (LVEF) was 24.4% (range 12-39). After signed informed consent, a median volume of 564 ml (range 248-950) of bone marrow was obtained from iliac puncture. Leuko-concentrated was performed using HES 6% and refrigerate centrifugation under sterile conditions. Concentrated mononuclear cells were implanted by coronarography of the venous sinus and in selected coronary arteries previous occlusion of the balloon «over wire». Median number of mononuclear and CD34+ cells infused were  $1,6 \times 10^9$  and  $2,21 \times 10^7$  respectively.

**Results:** During and after the procedures no arrhythmias or increase in enzymes or haemodynamic changes were observed. After a median time of 20,1 months, ABMMC led to significant improvement in functional NYHA class. Median ejection fraction improved significantly to 35,1% ( $p=0.003$ ). Among 18 evaluable patients, 13 (72%) reduced at less one NYHA class and 4 stayed at the same NYHA class, only one patient increase one NYHA class. There was no correlation between cells counts and NYHA or LVEF improvement.

**Conclusion:** Unselected ABMMC transplantation for CHF is feasible and safe; allows to infuse large volume of cells in quite poor irrigated coronary vessels. This study suggests the potential improvement of symptoms, functional capacity, myocardial perfusion and contractility of ABMMC transplantation in CHF.

**Key words:** Cellular therapy, cardiac failure, CD34, bone marrow.

El concepto tradicional que ha persistido durante años acerca de la incapacidad del corazón adulto para renovar sus células ha tenido que revisarse ante la evidencia de los resultados obtenidos en numerosos estudios que demuestran la existencia de células con capacidad proliferativa en el corazón humano.<sup>1-4</sup> El trasplante de corazón, aunque ha demostrado ser la solución definitiva de la insuficiencia cardiaca, no es aplicable a todos los pacientes, sobre todo por el déficit de donantes; por eso se requieren nuevas estrategias de tratamiento.<sup>5,6</sup>

La insuficiencia cardiaca es uno de los grandes síndromes cardiovasculares que más polémica e interés ha despertado en las últimas dos décadas por su elevada prevalencia, letalidad y costos que genera al sistema de salud y, en el plano individual, los inmensos porcentajes de incapacidad que produce.<sup>7</sup> La insuficiencia cardiaca es una epidemia devastadora que va en camino de convertirse en una gran pandemia; sólo en Estados Unidos se estima que alrededor de cinco millones de personas la padecerán y se diagnosticarán 400,000 casos anuales; el costo por todo lo vinculado con la atención de pacientes con insuficiencia cardiaca es aproximadamente de 70,000 millones de dólares.

La cardiopatía isquémica es la primera causa de muerte en la mayor parte de los países industrializados que puede llevar al individuo a la insuficiencia cardiaca si sigue el curso natural de la enfermedad y si no se corrigen los factores que pueden aumentar su severidad pueden llevar al remodelado ventricular.

El remodelado ventricular es un proceso por el que factores mecánicos, neuro humorales, y quizá genéticos, alteran el tamaño ventricular, su forma y función. Esto ocurre en varias situaciones clínicas, incluido el infarto

de miocardio, miocardiopatías, hipertensión arterial y enfermedades valvulares del corazón; se caracteriza por hipertrofia, pérdida de cardiomiocitos y aumento de la fibrosis intersticial. El infarto de miocardio, forma abrupta de manifestación de la cardiopatía isquémica, produce una pérdida aguda de cardiomiocitos en la zona afectada, que son sustituidos por tejido conectivo. En la actualidad se sabe que un infarto típico de miocardio que induce o provoca insuficiencia cardiaca mata, aproximadamente, mil millones de cardiomiocitos. La rehabilitación, como tratamiento de los pacientes con cardiopatía isquémica o insuficiencia cardiaca, o ambas, ha logrado ser útil y efectiva en la mejoría de su calidad de vida. Aunque no pueda restituirse el tejido conectivo por cardiomiocitos con función contráctil, ésta es su principal limitación.<sup>8-11</sup>

En los últimos años, los resultados de grandes estudios clínicos controlados han modificado de manera muy importante la terapéutica clínica, al haber demostrado mayor supervivencia y capacidad funcional; como ejemplo: The Consensus I y II, 1987 y 1992; The SOLVD, 1991; NETWORK, 1998 (con inhibidores de la convertasa) JESSICA, 1994; EMITA, 1997 (con amiodarona); FACT y REFLET, 1993 (con floseguinan); MDC, 1993; MEXIS, 1995; PRECISE, 1996; MERITHF, 1999 (con beta-bloqueadores). La incorporación de nuevos fármacos de efectividad comprobada y los adelantos tecnológicos y quirúrgicos, han modificado la historia natural y, por ende, las expectativas de vida de los pacientes con insuficiencia cardiaca y cardiopatía isquémica. Sin embargo, todavía un porcentaje elevado de pacientes sigue sin mostrar mejoría con el tratamiento farmacológico máximo y la morbilidad y mortalidad es progresiva con los años.

Ahora es posible inducir en el corazón adulto el desarrollo de cardiomiocitos, que es una estrategia prometedora en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca y la cardiopatía isquémica. Sin embargo, las características específicas de las células cardiacas, y la idea que se ha mantenido a lo largo de muchos años acerca de su incapacidad para entrar en el ciclo celular y dividirse de forma activa, han hecho que este enfoque se haya descartado. Varios estudios actuales efectuados en animales y seres humanos han abierto nuevos horizontes en este tema.<sup>1-14</sup>

Frente a esta realidad, en los últimos años se ha desarrollado un gran esfuerzo por buscar alternativas de tratamiento más factibles y asequibles que beneficien a la mayoría de pacientes que padece esta enfermedad. Así, en

---

Hospital Civil de Guadalajara; Clínica Bernardette, Guadalajara; Sangre de Cordón, Guadalajara, Jal; Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México.

Correspondencia: Dr. Antonio Carrasco Yalan. Correo electrónico: antonio1carrasco@hotmail.com  
Recibido: marzo 2012. Aceptado: abril 2012.

Este artículo debe citarse como: González-Ramella O, Nájara S, Cuneo-Pareto S, Flores E, Gazarian K, Carrasco-Yalan A. Implante de células mononucleares autólogas no manipuladas de médula ósea en insuficiencia cardiaca por enfermedad coronaria crónica. *Rev Hematol Mex* 2012;13(2):49-57.

[www.nietoeditores.com.mx](http://www.nietoeditores.com.mx)

la actualidad se ha abierto un nuevo y esperanzador campo de investigación y de aplicación clínica con el descubrimiento de la plasticidad de las células progenitoras y su utilización en terapia celular; es decir, la utilización de células progenitoras para el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas, colocándolas en el órgano o tejido lesionado para que éstas puedan reparar estructural y funcionalmente dicho órgano.

La aplicación clínica de la terapia celular o terapia regenerativa empezó a inicios del actual siglo, en el tratamiento de cardiopatías isquémicas agudas y crónicas, donde como paso inicial el implante de células mononucleares no manipuladas de médula ósea demostró ser factible y seguro (ausencia de complicaciones asociadas con el procedimiento). Los estudios posteriores, con diferentes fuentes de células troncales y progenitoras, utilizaron: tejido adiposo, músculo estriado y sangre de cordón umbilical; con la posterior selección de grupos celulares específicos como: células CD133+, mesenquimales, endoteliales y ALDH brillantes. A esto se agregó la técnica de implante que varió entre los estudios: aplicación intramural (con cirugía de tórax), aplicación intracoronaria, aplicación endocárdica y por seno venoso coronario.<sup>14-22</sup>

La terapia celular surge como una de las estrategias terapéuticas con futuro prometedor en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, aunque no exenta de controversias, lo que obliga a mayor conocimiento ante su aplicación clínica, lo que no contrapone iniciar ensayos clínicos que permitan un avance en esta dirección. Por esta razón, este ensayo clínico plantea que el implante de células mononucleares no manipuladas de médula ósea incrementa la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y favorece positivamente la evolución de la insuficiencia cardíaca crónica.

Este estudio establece como objetivo primario: evaluar la seguridad del implante de células mononucleares no manipuladas de médula ósea por vía coronaria y retrocoronaria a través del seno coronario y sus principales venas. Como objetivos secundarios: evaluar el efecto del implante endovascular de células mononucleares no manipuladas de médula ósea en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y la evolución clínica, según la clase funcional por NYHA. Otro objetivo más es relacionar si existe una correlación directa entre células nucleadas totales, células mononucleares totales y células CD34+; con el incremento de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) y mejora de la clase funcional NYHA.

## MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo al que se incluyeron 20 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica resistente al tratamiento convencional, con fracción de eyección del ventrículo izquierdo inferior a 40%, que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión para recibir implante de células mononucleares no manipuladas de médula ósea por vía coronaria y retrocoronaria a través del seno coronario y sus principales venas. Se incluyeron pacientes de uno y otro sexo que reunieron los siguientes criterios de inclusión: tener entre 18 y 80 años de edad, enfermedad coronaria crónica con fracción de eyección del ventrículo izquierdo inferior a 40%, resistencia al tratamiento médico convencional por insuficiencia cardíaca y angina, padecer insuficiencia cardíaca NYHA II-IV, con infarto reciente que haya sido tratado con angioplastia primaria con tiempo desde el último tratamiento del infarto de dos meses. Infarto agudo de miocardio con trombolisis fallida con tiempo desde el último tratamiento del infarto de dos meses. Pacientes no aptos para revascularización de cualquier tipo, no tratados con o sin angioplastia de algún vaso, pero que la angioplastia de ese vaso no modificó su pronóstico y que la angioplastia coronaria sirvió para favorecer el implante celular. Pacientes con coronariografía de enfermedad de múltiples vasos y con tejidos infartados no factibles de revascularización de cualquier tipo y quienes tuvieran arterias coronarias no permeables más allá del tercio medio.

Se excluyeron quienes tuvieron alguno de los siguientes criterios: evento coronario agudo que haya requerido atención hospitalaria en los últimos dos meses; seropositividad para VIH, hepatitis B o C activa, embarazadas y en periodo de lactancia, diagnóstico de cirrosis u otras enfermedades crónicas terminales, cáncer terminal o en tratamiento con quimioterapia, diagnóstico de infección crónica activa o en tratamiento, haber padecido en el mes previo alguna infección aguda severa, tratamiento crónico con corticoides, anemia moderada o severa, diagnóstico de enfermedad hematológica que implicara disfunción o insuficiencia medular, trastorno de la coagulación severo, insuficiencia renal crónica, inmunodeficiencias, alergia al yodo o a los medios de contraste vascular, antecedentes de asma o cualquier enfermedad generadora de insuficiencia respiratoria, insuficiencia hepática; antecedentes de

accidente cerebro vascular, discapacidad mental manifiesta, y que estuvieran siendo tratados con medicación antitrombótica o antiplaquetaria que contraindique el cateterismo.

Los criterios para la no evaluación final de la intervención fueron: infección aguda severa durante los primeros 90 días posimplante; otras circunstancias que condicionaran severo estrés al paciente durante los primeros 90 días postimplante: traumatismo mayor, embarazo, etc., pacientes con pérdida de seguimiento hasta los 90 días postimplante. Pacientes con seguimiento o controles incompletos (menos de tres controles postimplante o falta de control al tercero y sexto meses postimplante).

Los pacientes que reunieron los criterios de inclusión se refirieron al centro hospitalario con un resumen de su historia clínica para programación del tratamiento. Durante la entrevista recibieron toda la información detallada de su participación en el estudio, el tratamiento que recibirían, las posibles complicaciones y lo que se espera del mismo. Quienes desearon participar firmaron por duplicado el Consentimiento Informado de aceptación donde se especificaba el objetivo del estudio y las posibles complicaciones del procedimiento.

El mismo día que los pacientes firmaron el consentimiento informado, se programaron para la toma de muestras sanguíneas necesarias para los estudios de: hemograma, perfil de coagulación: tiempo de trombina, tiempo de tromboplastina parcial activada, tiempo de protrombina, pruebas de función hepática, creatinina y depuración de creatinina, perfil lipídico, electrocardiograma, ecocardiograma con determinación de fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), grupo sanguíneo Rh y radiografía de tórax postero anterior.

Los pacientes aceptados se hospitalizaron para completar cualquier estudio pendiente antes de entrar a la sala de operaciones o, de ser el caso, a la sala de hemodinámica.

### **Procedimientos de extracción e implante de mononucleares de médula ósea**

#### ***Extracción de médula ósea***

En la sala de operaciones se aspiraron, de ambas crestas iliacas, aproximadamente 500 mL de médula ósea, máximo 10 mL/kg. La médula ósea se colocó, mediante una llave de doble vía, en una bolsa de sangre con anticoagulante (heparina a la bolsa de colecta 7500 UI). Para el procedimiento de extracción de médula ósea sólo se utilizó

sedo-analgésia (con fentanilo, midazolam o propofol, solos o en combinación, según criterio del anestesiólogo) y anestesia local con 5 a 10 cc de xilocaína al 2% sin epinefrina, colocada en ambas crestas iliacas.

El procedimiento de extracción se realizó por dos médicos hematólogos que trabajaron simultáneamente, cada uno en cada cresta iliaca con la aguja Harvest Needle with side hole, MD Tech BMHN1304VX.

Luego del procedimiento de extracción de médula ósea, el paciente retornó a su habitación para luego ser llevado 3 a 4 horas después a la sala de hemodinámica para el implante de las células mononucleares de médula ósea. Cuando hubo dolor no tolerable en la zona de punción, se aplicaron analgésicos orales o parenterales, según fuera el caso.

El material obtenido se remitió a un laboratorio para leucoconcentración de la médula ósea a un volumen final de 100 a 120 mL. La médula ósea depleta de glóbulos rojos mediante el uso de HESTAR 6% y retiro manual de plasma, retornó a la sala de hemodinámica.

### **Procedimiento de implante de células mononucleares no manipuladas de médula ósea**

En la sala de hemodinámica, tres a cuatro horas después de la extracción de médula ósea, el paciente fue sometido, mediante cateterismo, al implante de células mononucleares no manipuladas de médula ósea. El implante celular se efectuó con una inyección retrógrada en el seno venoso coronario a través de un catéter balón de angioplastia coronaria "over wire" que se colocó en el tercio inicial del seno venoso coronario y arterias coronarias con el propósito de "estancar" el flujo coronario.

Se colocó un balón en el seno venoso coronario que se cateterizó a través de una punción subclavia, con un catéter Amplatz de coronaria izquierda mediante el que se colocó un balón ocluser y se efectuó un venografía coronaria retrógrada, previa al procedimiento. Se procedió a inflar el balón ocluser venoso coronario que permaneció inflado aproximadamente durante 10 a 15 minutos.

Luego de inflar el balón ocluser venoso a baja presión, se procedió a inyectar la suspensión de células mononucleares de médula ósea a través del orificio distal del catéter balón ocluser venoso. El balón inflado permaneció entre 13 y 15 minutos; en ese lapso se inyectaron entre 30 hasta 50 mL de suspensión celular. La inyección venosa coronaria se efectuó a una presión de seis atmósferas



con jeringa manual. Puesto que todo el procedimiento se realizó bajo heparinización general, la cánula venosa se retiró a la media hora de finalizado el procedimiento en la unidad coronaria.

El volumen total del concentrado de células mononucleares no manipuladas de médula ósea enviado del laboratorio (rotulado con la inscripción: “*células mononucleares no manipuladas de médula ósea*”) se infundió en el seno coronario y las arterias coronarias.

Para infundir las células mononucleares no manipuladas de médula ósea, el concentrado se cargó en jeringas de 20 mL y se procedió a inyectar ese volumen a través del catéter. Al finalizar cada infusión se lavó el lumen del catéter con 5 o 10 mL de suero fisiológico para asegurar que se infundieron todas las células mononucleares no manipuladas de médula ósea que pudieran quedar en el lumen. Al finalizar el procedimiento, el paciente permaneció en decúbito dorsal en su cama, sin poder movilizarse hasta que el médico intervencionista lo indicó.

#### *Seguimiento inmediato postimplante de células mononucleares no manipuladas de médula ósea*

Para el implante de células mononucleares no manipuladas de médula ósea, los pacientes se hospitalizaron durante 2 o 3 días por la posibilidad de que sobreviniera alguna complicación en el postcateterismo inmediato, elevación de enzimas de reacción aguda, daño al miocardio, arritmias u otras.

En la noche del mismo día del procedimiento y por dos días seguidos se realizó una evaluación médica. Durante ésta se preguntó por algún tipo de dolor u otras molestias y se hizo un examen clínico.

#### *Seguimiento posterior postimplante de células mononucleares no manipuladas de médula ósea*

El médico tratante fue quien hizo el seguimiento de cada paciente trasplantado y quien decidió e indicó la medicación, la dieta y el ejercicio individualizados. Durante el seguimiento los pacientes se entrevistaron, evaluaron clínicamente y controlaron con estudio de ecocardiografía.

#### **Análisis estadísticos**

La finalidad fue identificar si durante el procedimiento, desde el aspirado de médula ósea hasta 24 horas post-implante, hubo o no alguna complicación. El análisis estadístico se realizó con el software SPSS v 15.0 para demostrar la diferencia de medias de datos pareados con T de Student para la variación

de la FEVI. Para determinar si la cantidad total de células implantadas se relaciona con los cambios de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo se realizó la correlación binomial (correlación de Pearson).

## **RESULTADOS**

Del mes de mayo de 2007 al de julio de 2009, se incluyeron al protocolo 20 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión, firma de consentimiento informado y aceptación del protocolo por el comité de ética institucional de la Clínica Bernardette en Guadalajara, Jalisco, México. Las características basales se muestran en el Cuadro 1. En total se realizaron 25 procedimientos.

**Cuadro 1.** Características basales

<i>n</i> = 20	%
Mediana de edad en años (min-max)	62 (34-75)
Relación mujeres-hombres	3/17
Hipertensión arterial n (%)	7 (35)
Dislipidemia n (%)	8 (40)
Diabetes mellitus n (%)	2 (10)
Infarto de miocardio previo n (%)	9 (45)
Insuficiencia cardiaca n (%)	19 (95)
Cateterismo o puentes coronarios previos n (%)	3 (15)
Angina isquémica n (%)	3 (15)
NYHA I - II - III - IV	1 / 5 / 11 / 3
Fracción de eyección del ventrículo izquierdo (%), mediana (máxima-mínima)	24.4 (12-39)

Todos los pacientes (excepto uno) tenían insuficiencia cardiaca, de los que nueve tenían cardiopatía dilatada. El paciente sin insuficiencia cardiaca tenía cardiopatía isquémica crónica.

La mediana de volumen de extracción de médula ósea fue de 564 mL (límites: 248 y 950 mL) con medianas de infusión de  $7.0 * 10^9$  células nucleadas totales (límites:  $3,1 * 10^9$  -  $11,3 * 10^9$ );  $1,6 * 10^9$  células mononucleares totales (límites:  $0,7 * 10^9$  -  $2,9 * 10^9$ ) y  $2,21 * 10^7$  células CD34+ (límites:  $1,3 * 10^6$  y  $8,12 * 10^7$ )

#### **Objetivo primario: datos de seguridad**

El implante de células mononucleares no manipuladas de médula ósea fue seguro y sin eventos adversos serios y no serios en los 20 pacientes y 25 procedimientos realizados.



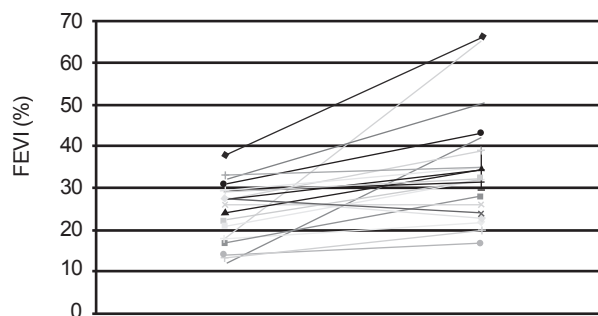
Los estudios de laboratorio peri procedimiento mostraron ausencia de inflamación o infarto de miocardio. No se registraron arritmias ventriculares durante el implante o posthospitalización. No se observó efusión pericárdica postimplante mediante ecocardiografía. Los pacientes salieron del hospital entre los 2 a 3 días postprocedimiento para seguimiento posterior en forma ambulatoria.

A cinco pacientes fue necesario realizarles otro procedimiento; cuatro de ellos para optimizar la respuesta clínica y al otro por deficiente respuesta al primer procedimiento. Dos pacientes fallecieron después del segundo procedimiento debido a complicaciones no relacionadas con el implante de células mononucleares no manipuladas de médula ósea; uno de ellos por mediastinitis por cirugía cardíaca por valvulopatía y otro por neumonía extrahospitalaria.

**Objetivos secundarios: evolución clínica**

De los 20 pacientes, dos no tuvieron seguimiento posterior al salir del hospital, por lo que los pacientes evaluables para objetivos secundarios fueron 18. La mediana de seguimiento de los 18 pacientes evaluables fue de 20.1 meses (límites 4.2 y 31.4 meses). La valoración de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) se realizó a la mediana de tiempo postprocedimiento de 14.2 meses (límites de 3.2 y 24.4 meses). De los 18 pacientes, 15 incrementaron el valor de la FEVI (83%), uno sin variación (6%) y dos (11%) con disminución de la FEVI a los 5 y 24 meses postprocedimiento. La variación del FEVI ( $\Delta$ FEVI) fue de 10.7% (Cuadro 2 y Figura 1).

Los cambios en la clase funcional están señalados en el Cuadro 3. La valoración de ésta en los 18 pacientes evaluables mostró: mejoría en al menos un punto de la clase funcional en 13 pacientes (72%), igual clase funcional en 4 pacientes (22%) y deterioro en la clase funcional en 1 paciente (6%). Destaca que 3 de los 11 pacientes NYHA III pasaron a NYHA I, es decir que hubo mejoría en dos clases funcionales. Si sólo se consideran pacientes NYHA III-IV que pudieron tener



**Figura 1.** Cambios en la FEVI (basal y seguimiento) n=18

control posterior (n= 12), todos menos uno mejoraron (92%) al menos una clase funcional NYHA.

Se evaluó si hubo alguna correlación significativa entre  $\Delta$ FEVI y mejora de la clase funcional; y cantidad de células nucleadas totales, células mononucleares totales y células CD34+ implantadas. Ninguno de los parámetros celulares mostró correlación directa ni inversa significativa con el incremento de la FEVI y de la clase funcional.

**DISCUSIÓN**

Por lo general, se aceptaba que el aumento de la masa cardíaca contráctil en el adulto sólo podía lograrse con la hipertrofia de los miocitos existentes. La evidencia de generación miocárdica en el estrés ha desafiado este dogma, y ha propuesto que la renovación de los miocitos es fundamental en la homeostasis cardíaca.<sup>22-38</sup>

Urbanek y colaboradores<sup>39</sup> reportaron un estudio de pacientes con estenosis aórtica, aumento de la masa miocárdica producto de una combinación de hipertrofia e hiperplasia de miocitos, esta última es el resultado de la diferenciación de stem cell (SC) de la misma línea celular de los miocitos. También Anversa<sup>40</sup> y su grupo

**Cuadro 2.** Incremento en los valores de FEVI

$\Delta$ FEVI	Basal (n=18)	Seguimiento (n=18)	Valor p
FEVI (%) Promedio	24.4 %	35.1 %	0.003

**Cuadro 3.** Cambios en clase funcional NYHA (basal)

	NYHA (seguimiento)				
	I	II	III	IV	Sin seguimiento
I (n=1)	1				
II (n=5)	2	2	1		
III (n=11)	3	6	1		1
IV (n=3)			2		1

plantean que desde el momento del nacimiento hasta la edad adulta, existe un equilibrio entre los estímulos que promueven el crecimiento de tamaño de los miocitos y los que pueden conducir a la apoptosis o muerte programada y la necrosis. El hecho que determinados procesos patológicos puedan provocar la muerte de cardiomiocitos y otras células cardiacas de forma tan importante, cuestiona el concepto de que el miocardio no tiene recambio celular, y de que las células que existen poco después de nacer son las que permanecerán a lo largo de la vida del individuo.<sup>28-32</sup>

Las SC han demostrado su eficacia en la mejoría clínica de los pacientes tratados, pero el mecanismo por el que el trasplante de cardiomiocitos mejora la función cardiaca aún se desconoce; se sugiere: atenuación de la expansión del infarto, por las propiedades de los cardiomiocitos, o angiogénesis inducida por factores de crecimiento secretados por citocinas existentes en estas células que resultan en mejoría del flujo colateral de sangre.<sup>33-35</sup>

Strauer y colaboradores reportaron en el 2002<sup>36</sup> el primer estudio en seres humanos de trasplante autólogo de SC proveniente de la médula ósea, en un paciente con infarto agudo de miocardio con impresionantes resultados, a las diez semanas se observó disminución del tamaño del infarto e incremento de la fracción de eyección ventricular, del índice cardiaco y del volumen sistólico en comparación con los pacientes que no recibieron terapia celular. Esta mejoría de la función ventricular se atribuyó al aumento de la perfusión miocárdica medida mediante isótopos radiactivos.

Se han publicado no menos de siete estudios clínicos en los que se han utilizado las vías intracoronaria, subendocárdica o intramiocárdica; se han implantado células mononucleares de médula ósea, células enriquecidas en progenitores hematopoyéticos o endoteliales, o mioblastos, y los resultados se han monitorizado mediante técnicas de imagen como resonancia magnética, ecocardiografía o tomografía por emisión de positrones. Todos los pacientes han recibido, además de las células, tratamientos adicionales.<sup>37-54</sup> Algunos estudios mostraron eventos adversos como arritmias con el uso de mioblastos.<sup>55</sup>

Nuestros resultados reproducen las experiencias de otros grupos y se fundamentan en tres elementos:

1. Seguridad del procedimiento, que puede repetirse para optimizar la respuesta. Está exento de eventos adversos serios y no serios.

2. La FEVI se incrementó, en promedio, 10.7% lo que favoreció a 83% de los pacientes evaluables. Si bien en algunos paciente el incremento fue pequeño, hubo un caso que requirió dos procedimientos con  $\Delta$  FEVI de 47%.
3. Mejoría en la clase funcional por NYHA como parámetro clínico indiscutible: 72% de los pacientes evaluables mejoraron, al menos, una clase funcional y este porcentaje fue mucho mayor en los pacientes NYHA III-IV evaluables en la que se logró 92% de mejoría en una clase funcional.

Es pertinente considerar algunos aspectos adicionales a estudiar en los pacientes reclutados en este estudio:

- De lo 20 pacientes, hay 18 a los que se les puede realizar estudio funcional cardiaco con resonancia magnética para determinar: viabilidad miocárdica, remodelación miocárdica y volúmenes sistólicos-diastólicos finales del ventrículo izquierdo.
- Los estudios de resonancia magnética a un promedio de tiempo postterapia de 20 a 24 meses permitirán determinar si las mejoras en la  $\Delta$  FEVI son sostenibles en el tiempo.

Los resultados obtenidos garantizan continuar con estudios similares en pacientes con cardiopatía crónica, principalmente en insuficiencia cardiaca, que no respondan a terapia farmacológica y a los que no se les pueden ofrecer otras estrategias terapéuticas, como stent, cirugía, sincronizador cardiaco o combinación de cualquiera de ellas. De igual forma, al no encontrar correlación en cantidad de células nucleadas totales, mononucleares o CD34+ con  $\Delta$  FEVI debe moderarse el volumen de médula ósea obtenida a 5 mL/kg de peso; con la posibilidad de selección de grupos celulares específicos o cultivos.

En virtud de los resultados obtenidos en este estudio clínico, se recomienda la elaboración de uno nuevo con aproximadamente 30 pacientes con diagnóstico de insuficiencia cardiaca NYHA III-IV con FEVI menor o igual a 35%, con la utilización de la misma técnica de implante y de procesamiento celular; además de estudios de resonancia magnética preliminar y a los 12 meses y a los 24 meses postprocedimiento. Los pacientes con insuficiencia cardiaca NYHA III-IV y FEVI  $\leq$ 35% se favorecen de manera muy significativa con el procedimiento y se logra la disminución de la morbilidad y mortalidad por insuficiencia cardiaca.

## REFERENCIAS

1. Körbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair. A new therapeutic concept? *N Engl J Méd* 2003; 349:570-582.
2. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106:1913-1918.
3. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361:45-46.
4. Assmus B, Schachinger V, Tempe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction. *Circulation* 2002; 106: 3009-3017.
5. VIVA Trial TD Henry et al. *Circulation* 2003;107:1359-1365.
6. Assmus B, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in AMI (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106:3009-3017.
7. Lederman R, et al. TRAFFIC Study. *Lancet* 2002; 359: 2053-58.
8. Tateishi-Yuyama E, et al. Angiogenesis for patients with Limb Ischaemia by Autologous transplantation of Bone-marrow cells. *Lancet* 2002; 360: 427-435.
9. Giodano FJ, et al. Retrograde coronary perfusion: a superior route to deliver therapeutics to the heart?. *JACC* 2003; 42:1129-1131.
10. Perin PC, Dohman HFR, Borojevic R, et al. Transendocardial autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003; 107:2294-2302.
11. Gensini G, Di Giorgi S, Murad S, et al. The coronary circulation: a roentgenographic study. Booth # 91 Eleventh Annual Convention The American College of Cardiology. May 29,30,31, June 1, 1962 Denver, Colorado.
12. Murad-Netto S, et al. Importância do cateterismo do seio coronário no diagnóstico da insuficiência coronária. II Simpósio Nacional sobre aterosclerose coronária. São Paulo,1973 Editor J. Eduardo M.R. Sousa, 63-67.
13. Hyun-Jae Kang, Hyo-Soon Kim et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem cells mobilized with. Seoul Nat. University. *The Lancet* 2004;363.
14. Patel AN, Geffner RL, Fernandez V, et al. Cardiothorax Surgery University of Pittsburg, Benetti Foundation rosario Argentina, Baylor Univ. Medical Center Dallas Texas. Surgical treatment for congestive Heart Failure using Autologous Adult Stems cells transplantation. *Journal Cardiothorax*.
15. Stem cell therapy for acute myocardial infarction through retrograde coronary perfusion: a new technique. Stans Murad Netto, MD, PhD; Roberto Fernandez Viña, MD, Rogério Moura, MD; Antônio Manoel Neto, MD; Neison Duarte, MD; Fernando Barreto, MD; André Jensen, MD, MD; Jorge Saslavsky, MD; Marcelo Fernández Viña, MD; Luiz Martins Romeo, MD, PhD; José Geraldo Amino, MD. Instituto do Coração e da Criança do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro - Brasil Fundacion Don Roberto Fernandez Viña/ Centro Cardiovascular - San Nicolas – Argentina Georgetown University ( Department of Oncology and Immunology ) – Washington-EUA Universidade Federal Fluminense - UFF - Niterói – Brasil Presentado en Sociedad Brasileira de Cardiologia 2003 Diciembre
16. Fernandez Viña y col. The increased of C-peptide level in type I diabetes after transplant of adult hematopoyetic mononuclear CD 34+ CD 38+ (TECELDIAB). *Cytotherapy* 2006; 8, suppl 1, abst 39.
17. Massie BM, Shah NB. The heart failure epidemic: magnitude of the problem and potential mitigating approaches. *Curr Opin Cardiol* 1996;11:221-26.
18. Senni M, Tribouilloy CM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ, Evans JM, Bailey KR et al. Congestive heart failure in the community. A study of all the incident cases in Olmsted County, Minnesota, in 1991. *Circulation* 1998;98:2282-9.
19. Garg R, Packer M, Pitt B, Yusuf S. Heart failure in the 1990S: evolution of a major public health problem in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* 1993;22(Suppl A):A3-A5.
20. Parmley WW. Pathophysiology of conestive heart failure. *Clin Cardio* 1992;15(Supp II):5-12.
21. Massie BM, Shah NB. Evolving trends in the epidemiologic factors of heart failure: rationale for preventive strategies and comprehensive disease management. *Am Heart J* 1997;133:703-12.
22. Ho KKL, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol* 1993;22(Sppl A):6A-13A.
23. Brotons C, Moral I, Rivera A, Pérez G, Cascant P, Bustins M, et al. Tendencias de la morbimortalidad por insuficiencia cardiaca en Cataluña. *Rev Esp Cardiol* 1998;51:972-6.
24. American Heart Association. 2001 Heart and Stroke Statistical Update. Dallas: American Heart Association; 2000.
25. Kannel WB. Epidemiology of heart failure in United States. En: Poole-Wilson PA, Colucci WS, Massie BM, Chatterje K, Coats AJS, eds. *Heart Failure*. New York: Churchill Livingstone;1997.
26. Sutton MGSJ, Sharpe N. Left ventricular remodelling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000;101:2981-8.
27. Eichhorn EJ, Bristow MR. Medical therapy can improve the biological properties of the chronically failing heart: a new era in the treatment of heart failure. *Circulation* 1996;94:2285-96.
28. Jessup M, Arozena S. *Heart Failure*. *N Engl J Med* 2003;348(20):2007-18.
29. Izhak K, Lior G. Human embryonic stem cell derived cardiomyocyte for Myocardial repair; present state and future perspective. *J Israel Heart Soc* 2002;12(2):4-11.
30. Barrera JDS, Rivas EE, Álvarez JAG, Hernández RG. Rehabilitación cardiaca en el anciano. *Rev Cubana Cardiol Cir Cardiovas* 2001;15(1):31-5.
31. Bristow MR, Gilbert EM, Abraham WT. Carvedilol produces dose-related improvements in left ventricular function and survival in subjects with chronic heart failure. MOCHA (Multi-center Oral Carvedilol Heart Failure Assessment). *Circulation* 1994;94:2807-16.
32. CIBIS II Investigators and Commitees. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II). A randomezed trial. *Lancet* 1999;353:9-13.
33. Carpentier A, Chachques JC. Myocardial substitution with a stimulated skeletal muscle: first successful clinical case (letter). *Lancet* 1985;1:1267.
34. Revuelta JM. Operación Batista: realidad o ficción. *Rev Esp Cardiol* 2000; 53:1021.
35. Pérez de la Sota E, Rodríguez JE, Cortina JM, Randas Batista JV, López MJ. Resultados precoces de la ventriculectomía parcial izquierda (operación Batista). *Rev Esp Cardiol* 2000;53:1022-7.

36. Cerdán G, Artigas V, Romero BF, Rodríguez M, Ayats E, Allende L, et al. Complicaciones abdominales graves en los pacientes sometidos a trasplante cardiaco: el problema de la inexpresividad clónica. *Rev Esp Cardiol* 2000;53:916-26.
37. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernández A, Sorg RV, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in human. *Circulation* 2002;106:1913-1918.
38. Tam SK, Gu W, Mahdavi V, Nadal-Ginard B. Cardiac myocyte terminal differentiation. Potential for cardiac regeneration. *Ann NY Acad Sci* 1995;752:72-9.
39. Nadal-Ginard B. Inducción de nuevos cardiomiocitos en el corazón adulto: futuro de la regeneración miocárdica como alternativa al trasplante. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:543-50.
40. Urbanek K, Quaini F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B. Intense myocyte formation from cardiac stem cell in human cardiac hypertrophy. *PNAS* 2003;100(18):10445.
41. Anversa P, Palackal T, Sonnenblick EH, Olivetti G, Megges LG, Capasso JM. Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia on the hypertrophied aging rat heart. *Circ Res* 1990;67:871-885.
42. Endo T, Nadal-Ginard B. Reversal of myogenic terminal differentiation by SV 40 large T antigen results in mitosis and apoptosis. *J Cell Sci* 1998;111:1081-93.
43. Leri A, Barlucchi L, Limana F, Deptala A, Darzynkiewicz Z, Hintze TH, et al. Telomerase expression and activity are coupled with myocyte proliferation and preservation of telomeric length in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci* 1991;98(15):8626-31.
44. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114(6):763-76.
45. Chimenti C, Kajstura J, Torella D, Urbanek K, Heliński H, Cusi C, et al. Senescence and death of primitive cells and myocytes lead to premature cardiac aging and heart failure. *Circ Res* 2003;93(7):604-13.
46. Urbanek K, Quaini F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B, et al. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100(18):1440-1445.
47. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Anversa P, Annarosa L. A matter of life and death: cardiac myocyte apoptosis and regeneration. *J Clin Invest* 2003;111(10):1457-1459.
48. Orlic D, Hill JM, Ara AE. Stem cell for Myocardial Regeneration. *Circ Res* 2002;91:1092-102.
49. Cardoso FP, González JH, Alegría Ezquerro AE. Utilización de células madres para la regeneración miocárdica en la insuficiencia cardíaca. *Rev Esp Cardiol* 2003;56:935-939.
50. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001;344:1750-1757.
51. Jiang Y, Jahagirdar BM, Reinhardt RL, Schewartz RE, Keene CD, Ortiz-González XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cell derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-49.
52. Seale P, Asakura A, Rudnicki MA. The potential of muscle stem cell. *Dev Cell* 2001;1:333-342.
53. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003;361:47-49.
54. Menasché P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1078-1083.
55. Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A, Wetzel K, Edge ASB, Jacoby DB, et al. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:879-888.
56. Menasché P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001;357:279-280.

## Neutropenia congénita asociada con estrabismo y nistagmus: nuevo síndrome ligado al cromosoma X. Estudio de una familia

Carlos S. Ron Guerrero\*

### RESUMEN

**Antecedentes:** la neutropenia congénita es una inmunodeficiencia primaria con modo de herencia heterogéneo. Puesto que los genes afectados se localizan en los autosomas o gonosomas su paso a través de las generaciones abarca todo el espectro de herencias mendelianas y las ligadas al cromosoma X. La neutropenia congénita se caracteriza por neutropenia crónica debido a un defecto constitucional congénito. En la última década se descubrieron las bases moleculares de varias entidades lo que ha facilitado su clasificación.

**Objetivo:** reportar el caso de una mujer con neutropenia congénita, con detención de la maduración de mielocitos a metamielocitos; albinismo parcial, nistagmus, estrabismo convergente, con antecedentes de genética ligada al cromosoma X.

**Material y método:** se describe el caso de una niña que a los cuatro años de edad se le diagnosticó neutropenia congénita, estrabismo convergente, nistagmus horizontal y albinismo parcial, a la que se le dio seguimiento durante 17 años, hasta su defunción debida a insuficiencia respiratoria relacionada con fibrosis pulmonar. Durante el periodo de seguimiento se identificaron tres miembros femeninos más de la familia con las mismas características fenotípicas. La investigación del árbol genealógico mostró un patrón de herencia probablemente ligado al cromosoma X, con letalidad en los varones afectados. Durante ese periodo no se han reportado casos con un síndrome similar al descrito.

**Resultados:** paciente femenina que desde la edad infantil presentó neutropenia severa con infecciones de repetición en la piel, vías respiratorias altas, bajas, otitis y gingivitis, con respuesta a la administración de factores estimulantes de colonias de granulocitos, con normalización de la cuenta de neutrófilos. Inició con fibrosis pulmonar a los 21 años y falleció un año después por insuficiencia respiratoria. Durante la elaboración de la historia genética familiar se identificaron, en dos familias, tres miembros del sexo femenino con las mismas características del síndrome. En una familia dos hermanas resultaron afectadas, una de ellas falleció por infección intraabdominal a los 10 años y la otra de 21 años sigue viva con infecciones de repetición y neutropenia de moderada a severa. La tercera afectada es una niña de dos años de edad, prima hermana de la anterior, con las mismas características del síndrome. Se revisaron los distintos síndromes de neutropenia congénita conocidos y descritos; sin embargo, no fue posible empatar todos los hallazgos fenotípicos, morfológicos o en patrón de herencia observados en el caso motivo del reporte.

**Conclusión:** se trata de un nuevo síndrome aún no descrito en la bibliografía médica, caracterizado por: neutropenia congénita severa relacionada con detención de la maduración de los granulocitos, albinismo parcial, estrabismo convergente y nistagmus, con patrón de herencia quizá ligado al cromosoma X. Es importante la investigación del defecto genético molecular de los casos afectados para su inclusión en la clasificación de las neutropenias congénitas.

**Palabras claves:** neutropenia congénita, albinismo, nistagmus, estrabismo, fibrosis pulmonar.

### ABSTRACT

**Background:** Congenital neutropenia is a primary immunodeficiency whose mode of inheritance is heterogeneous, affected genes can be located in the autosomes or in the gonosomes, therefore its prevalence throughout generations covers the entire spectrum of Mendelian inheritances as well as of chromosome X linked inheritances. Congenital neutropenia is characterized by chronic neutropenia due to a congenital constitutional defect. In the past decade the molecular bases of several entities that facilitate a classification have been discovered.

**Objective:** To report the case of a woman with Congenital neutropenia, with maturation halt in the myelocytes to metamyelocytes phase: partial albinism, nystagmus, convergent strabismus, with a genetic history linked to the X chromosome.

**Material and Methods:** A 4 years old girl was identified with Congenital neutropenia, convergent strabismus, horizontal nystagmus and partial albinism; she was followed up for 17 years until she died of respiratory failure secondary to pulmonary fibrosis. During this period of time we expected a similar syndrome description to arise, however no other syndrome appeared. Nevertheless, three family members appeared with the same characteristics of the syndrome and we did the investigation through a family tree, we found it was linked to the X chromosome and lethal in males affected.

**Results:** The patient had repeated upper and lower respiratory tract infections at a young age as well as otitis, gingivitis and skin infections. It was characterized by severe neutropenia with normalization of neutrophils with the application of G-CSF. The patient died at 22, she developed pulmonary fibrosis one year earlier. In her genetic history three more women were identified with the same syndrome: two first cousins, one of them died at age 10 from an intra-abdominal infection, the other one survives but suffers from repeated infections and moderate to severe neutropenia; the other one is 2 years old, she is first cousin of the patient that still survives, with the same characteristics



of the syndrome. Comparisons were carried out with the different syndromes known that could be considered as one more of the ones already described; however, not all phenotype, genetic or histological characteristics were linked. Therefore, it is important to investigate a genetic molecular defect to include it in the current classification of congenital neutropenias.

**Conclusions:** This is a new syndrome not described yet in medical literature; it is characterized by congenital neutropenia with a halting of granulocyte maturity in the myelocyte to metamyelocyte phase, partial albinism, convergent strabismus, nystagmus and probably linked to the X chromosome.

**Key words:** Congenital neutropenia, albinism, pulmonary fibrosis.

El término “neutropenia congénita” es de uso heterogéneo en la bibliografía médica.<sup>1-4</sup> Una definición muy restrictiva reserva el término “neutropenia congénita” para formas severas sin asociar anomalías inmunológicas o extra-hematopoyéticas.

La neutropenia congénita es una inmunodeficiencia primaria con modo de herencia heterogéneo. Los genes afectados pueden localizarse en los autosomas (cromosomas 1 al 22) o gonosomas (X e Y), por lo que su paso a través de las generaciones abarca todo el espectro de herencias mendelianas y las ligadas al cromosoma X. La neutropenia congénita comprende una variedad de rasgos fenotípicos genéticamente heterogéneos. La elucidación molecular del defecto genético subyacente aclara los defectos funcionales de los neutrófilos. Las variantes no sindrómicas de neutropenia congénita son causadas por mutaciones en ELA2, HAX1, GFI1, o WAS. Las variantes sindrómicas de neutropenia congénita pueden deberse a mutaciones en genes que controlan el metabolismo de la glucosa o la función lisosomal. A pesar del progreso en este campo, muchos pacientes con neutropenia congénita no pueden ser definitivamente clasificados por medios genéticos.<sup>5</sup>

La neutropenia congénita se caracteriza por su cronicidad debida a un defecto constitucional congénito. En la última década se descubrieron las bases moleculares de varias entidades lo que ha facilitado su clasificación.<sup>6</sup>

\* Hematólogo del Centro Estatal de Cancerología de Nayarit de los SSN. Av. Enfermería s/n, coloniaS/N. Col. Fray Junípero Serra. Tepic CP 63170 Nayarit, México. Correo electrónico doctorcron@gmail.com.

Este artículo debe citarse como: Ron-Guerrero CS. Neutropenia congénita asociada con estrabismo y nistagmus: nuevo síndrome ligado al cromosoma X. Estudio de una familia. *Rev Hematol Mex* 2012;13(2):58-64.

Recibido: marzo 2012. Aceptado: mayo 2012.

www.nietoeditores.com.mx

La neutropenia se define como la reducción en el número absoluto de neutrófilos en la circulación sanguínea, con una cuenta menor de 1,500 por mm<sup>3</sup> en niños mayores de un año y por debajo de 2,000 por mm<sup>3</sup> en niños entre 2 y 12 meses de edad.<sup>7-9</sup> La neutropenia es severa cuando la cantidad de neutrófilos es menor de 500 por mm<sup>3</sup> y se considera crónica si dura más de tres meses en forma permanente o intermitente. Se le denomina “central” cuando el compartimento de la médula ósea tiene menos precursores de neutrófilos debido a la deficiencia de la maduración en estadios tardíos (sobre todo menos de 10% de neutrófilos maduros) y “periférica” si la maduración de los neutrófilos en la médula ósea es normal.<sup>10</sup>

La prevalencia de la neutropenia congénita es de seis casos por millón de habitantes. En el registro francés 30% de los pacientes tuvieron neutropenia por mutación de un gen elastasa de neutrófilos (ELANE) (20% neutropenia severa congénita y 10% neutropenia cíclica), 30% tuvieron síndrome de Shwachman-Diamond, 5% enfermedad por almacenamiento de glucógeno Ib y 35% otras alteraciones (1 o 2% de cada una).<sup>6</sup>

Se describe el caso de una paciente con neutropenia congénita permanente, severa y central que con seguimiento desde los cuatro años de edad, hasta su fallecimiento a los 22 años, asociada con un defecto familiar aún no descrito en la bibliografía médica.

El propósito de la publicación de este caso es describir sus características genéticas y clínicas como un síndrome nuevo identificado en una familia afectada.

### Descripción del caso

Se reporta el caso de una mujer que murió a los 22 años de edad debido a insuficiencia respiratoria. Nació en 1988, con cabello claro, tez blanca, estrabismo convergente y nistagmus horizontal. Con braquicefalia, facies característica, pectus carinatum-excavatum,



escoliosis torácica, clinodactilia bilateral, ambos pies con desviación interna y sindactilia entre el segundo y tercer orjejo. Tres años después tuvo infecciones recurrentes de las vías respiratorias altas y bajas, otitis y gingivitis severas (Figura 1). Una citometría hemática mostró neutropenia severa (Figura 2A), con monocitosis leve compensatoria. El extendido de sangre periférica corroboró la disminución de neutrófilos y ninguno de los leucocitos mostró anomalías morfológicas. El aspirado de médula ósea mostró riqueza celular normal, con detención de la maduración de los granulocitos a nivel de los mielocitos, con menos de 10% de neutrófilos maduros (Figura 2-B).

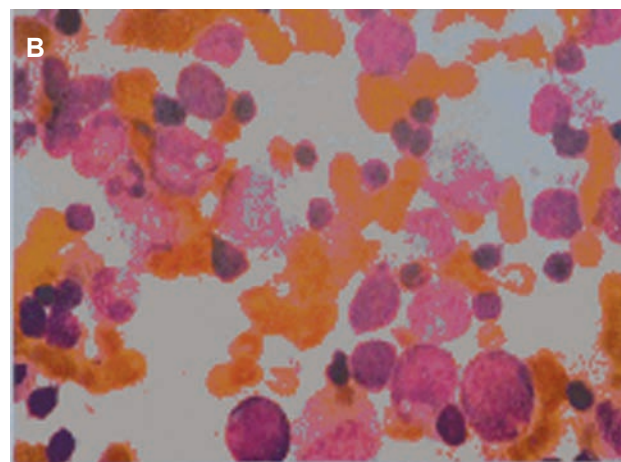
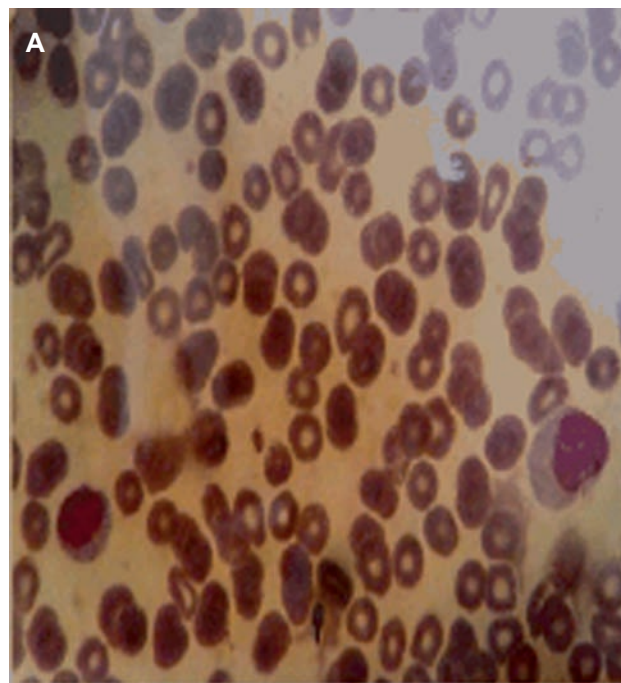
Su desarrollo motriz fue ligeramente retardado, inteligencia normal. Toda su familia es originaria de una comunidad rural de 286 individuos. Única hija de padres con tez morena clara, cabello oscuro y sanos.

Las infecciones de la paciente fueron tratadas con antibióticos y frecuentemente con factor estimulante de colonias de granulocitos (FEC-G). Se casó a la edad de



**Figura 1.** Paciente a la edad de cuatro años, con cabello rubio y deformación dental y gingival por las infecciones recurrentes.

18 años y procreó una niña sana, sin el fenotipo. El 16 de agosto del 2008 tuvo dolor abdominal por litiasis vesicular por lo que se programó para cirugía. Su hemoglobina es de 13.0 g/dL, hematócrito de 37.4%, plaquetas de 198,000/mm<sup>3</sup>, leucocitos de 2,060/mm<sup>3</sup>, neutrófilos 15.1% en el recuento diferencial (309 neutrófilos totales)



**Figura 2. A)** Microfotografías del extendido de sangre periférica y **B)** de la médula ósea que muestra la ausencia de neutrófilos segmentados.

y 16% de monocitos. Urea, creatinina, glucosa, tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada normales. Proteínas totales de 8 mg/dL, con albúmina de 4.5 y globulinas de 3.5 mg/dL. Colesterol total de 134 mg/dL. Bilirrubinas normales. Recibió FEC-G con normalización de los neutrófilos y se intervino quirúrgicamente sin complicaciones.

El 15 de mayo de 2010 tuvo tos con expectoración blanquecina y algunas veces amarillenta, sin sangre, disnea

de esfuerzo y pérdida de peso (Figura 3). Una radiografía de tórax mostró infiltrado micronodular difuso bilateral (Figura 4A), no se observaron bacilos ácido alcohol resistentes, el cultivo mostró un estreptococo beta hemolítico sensible a cefalosporinas y quinolonas. Hemoglobina de 13.0 g/dL, hematócrito de 39.6%, leucocitos de 2020/mm<sup>3</sup>, plaquetas de 200,000/mm<sup>3</sup>, recuento total de neutrófilos de 319 por mm<sup>3</sup> y monocitos 11%.

La TAC de pulmón mostró infiltrado bilateral pulmonar en vidrio despulido compatible con fibrosis pulmonar (Figura 5). Se la controló con broncodilatadores de acción corta y larga, antibióticos y mucolíticos. Experimentó mejoría parcial pero se agravó durante las siguientes semanas hasta ser dependiente de oxígeno. El 25 de mayo de 2010 tuvo hemoglobina de 12.6 g/dL, leucocitos de 350/mm<sup>3</sup> con seis neutrófilos totales por mm<sup>3</sup>, 83,000/mm<sup>3</sup> plaquetas, urianálisis, glucosa, urea y creatinina normales. Cinco días después la hemoglobina fue de 12.0 g/dL, la cuenta de leucocitos de 890/mm<sup>3</sup>, y la de neutrófilos de 13.1% (neutrófilos totales 117/mm<sup>3</sup>), plaquetas de 63,000/mm<sup>3</sup>, deshidrogenasa láctica de 729 UI/L (normal de 91-180 UI/L). La insuficiencia respiratoria se incrementó con disnea en reposo, mareos,

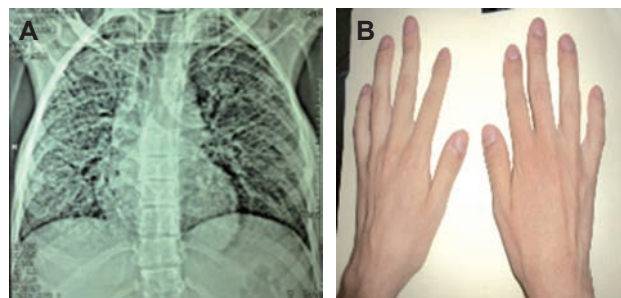
náusea y fiebre de 38.5°C, pérdida de peso con IMC de 16. Desgaste físico, atrofia muscular generalizada, ausencia de grasa corporal, estertores rudos y alveolares, dedos de manos hipocráticos (Figura 4B). La paciente murió a consecuencia de la insuficiencia respiratoria el 30 de abril de 2011, a la edad de 22 años.

Tres miembros familiares más fallecieron con las mismas características fenotípicas asociadas con neutropenia, una de ellas prima de la paciente aludida, falleció a los 10 años de edad y otra, prima hermana de la que murió, tiene 21 años de edad y sigue viva (Figura 6A). Hace dos años nació el tercer miembro familiar (Figura 6B), prima de las dos hermanas afectadas, con las mismas características fenotípicas pero sin evidencia hasta ahora de infecciones repetidas.

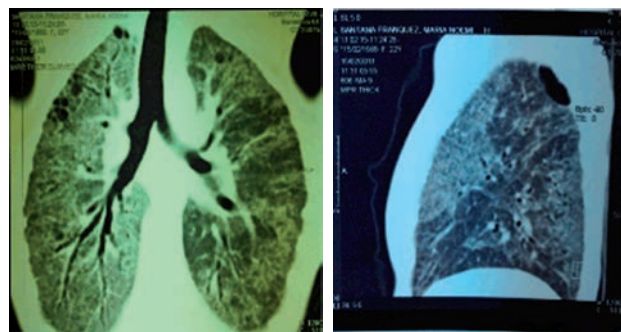
El árbol genealógico muestra que sólo las mujeres afectadas superviven y los hombres probablemente afectados no alcanzaron a nacer (Figura 7). La historia genética indica asociación con el cromosoma X.



**Figura 3.** Paciente a la edad de 22 años, con desnutrición y dolicocefalia. Tres meses antes de su muerte.



**Figura 4.** A) Radiografía de tórax con fibrosis pulmonar. B) Imagen de ambas manos con dedos hipocráticos.



**Figura 5.** TAC de pulmón con fibrosis pulmonar y una gran bula apical en la lateral del pulmón derecho.



**Figura 6. A)** Prima hermana de la paciente 21 años de edad y **B)** niña de 2 años de edad, únicas sobrevivientes mostrando el fenotipo del síndrome que se describe.

**DISCUSIÓN**

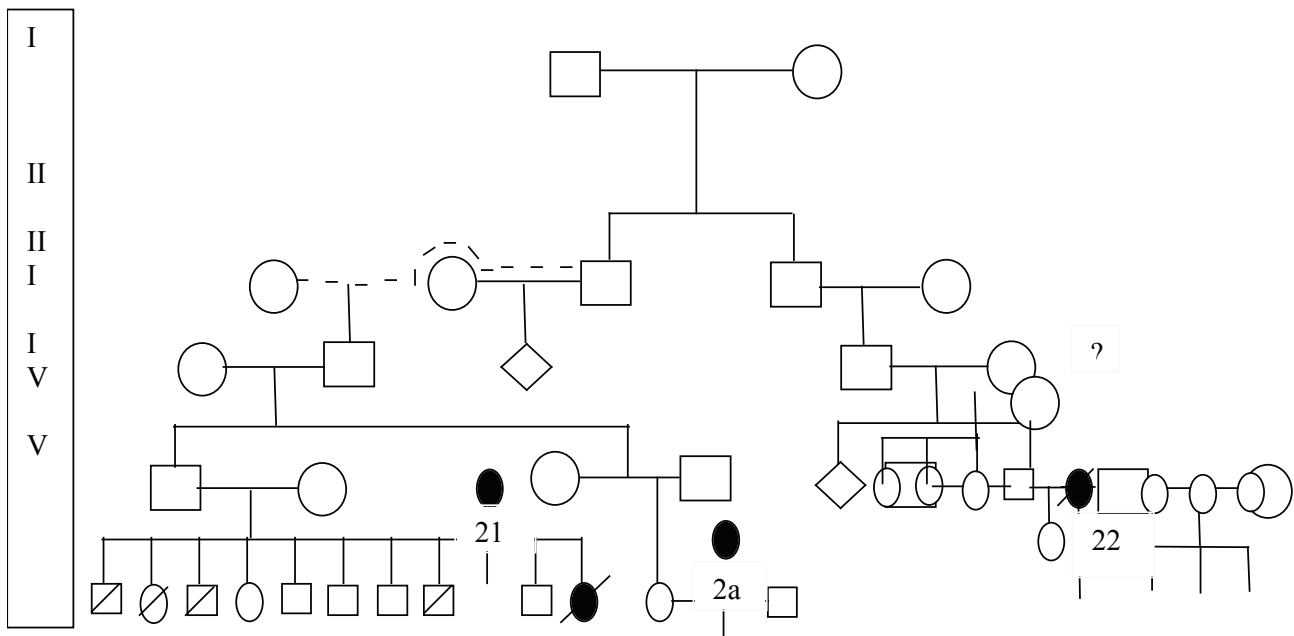
La neutropenia congénita es una condición patológica que se manifiesta sola o asociada con otras alteraciones hematológicas o extrahematológicas. La neutropenia puede ser desde leve a severa, con disminución de la supervivencia de los pacientes afectados, que padecen infecciones que conducen a estados mórbidos y riesgo de mortalidad.

Se comunica un síndrome aún no descrito en la bibliografía médica de una familia con neutropenia moderada a severa, con detención de la maduración de los precursores de los granulocitos en estadio de

mielocitos a metamielocitos, asociada con albinismo parcial, nistagmus y estrabismo convergente.

La neutropenia congénita severa es vista en el síndrome de Kostmann, descrita en 1956. Se caracteriza por neutropenia severa, que sobreviene en las primeras semanas de la vida, con detención de la maduración de los granulocitos a nivel de los promielocitos. La muerte se debe a infección bacteriana.<sup>11</sup> Dos isoformas de proteínas HAX1 se han asociado y los pacientes con frecuencia tienen retraso mental y epilepsia.<sup>12</sup> El caso que se reporta y sus familiares relacionados afectados, aunque han tenido neutropenia muy severa hasta condicionar la muerte por infección intraabdominal en una de las primas hermanas de la paciente que se describe, ninguna de ellas padeció retraso mental ni convulsiones. En el síndrome de Kostmann, la mayoría de los casos son esporádicos, pero puede observarse un rasgo autosómico dominante letal y recesivo. A diferencia del caso y la familia que se estudió mediante la historia genética, se presume un síndrome ligado al cromosoma X con letalidad en varones.

La neutropenia congénita asociada con albinismo parcial o completo se reporta en el síndrome de Hermansky-Pudlak tipo 2 que se caracteriza por san-



**Figura 7.** Árbol genealógico que muestra los pacientes afectados en una familia que habita una población de 286 habitantes. Sólo las mujeres presentan las características del síndrome y los varones recién nacidos mueren. La liga de la enfermedad es debida a la frecuencia alela por efecto endogámico de la población.



grados prolongados por defecto en los gránulos de las plaquetas, albinismo oculocutáneo y linfocitosis hemofagocítica (HLH) familiar. Todos los casos tuvieron nistagmus y algunos fibrosis pulmonar. La cuenta de neutrófilos suele ser menor de  $1000/\text{mm}^3$ , la médula ósea muestra macrófagos pigmentados y detención de la maduración de los progranulocitos y mielocitos.<sup>13</sup> La neutropenia es causada por mutación en AP3B1, adaptador de la proteína AP3 citosólica. En el caso motivo del reporte y sus familiares afectados descritos en este artículo, ninguno presentó alteraciones hemorrágicas y sus plaquetas fueron en número y morfología normal. Además, en el síndrome de Hermansky-Pudlak el defecto está ligado a una forma autosómica recesiva, a diferencia del caso que nos ocupa en donde se asocia con cromosoma X y los macrófagos en la médula ósea eran normales.

Otro síndrome con albinismo parcial y neutropenia severa es la deficiencia de la proteína AP14, involucrada en el tráfico intracelular de endosomas.<sup>14</sup> Sólo se ha identificado en una familia de menonitas consanguíneos y la médula ósea no muestra alteraciones en la maduración de la serie granulocítica, como las que ocurren en el síndrome de Chédiak-Higashi, Griscelli y ahora en el síndrome que se describe en este artículo.

La enfermedad de Chédiak-Higashi se caracteriza por albinismo óculo-cutáneo parcial, alteraciones neurológicas, reparto anormal de melanosomas en el cabello, gránulos gigantes en todos los neutrófilos y en los precursores de la serie granulocítica, inclusiones rojas brillantes en algunos linfocitos, defecto de la actividad bactericida y disfunción de las células NK. La neutropenia debida a destrucción en la médula ósea ocurre tempranamente en esta afectación antes del desarrollo de la linfocitosis hemofagocítica.<sup>15</sup> En el síndrome de Griscelli tipo 2, muestra muchas características del síndrome de Chédiak-Higashi incluido: el rasgo autosómico recesivo y, sobre todo, albinismo; deficiencia inmunitaria y algunas veces HLH. Difiere del síndrome de Chédiak-Higashi por la ausencia de los gránulos en las células sanguíneas y el aspecto microscópico del cabello. La neutropenia en el síndrome de Griscelli puede ser aislada o durante el curso de la activación de los macrófagos.<sup>6</sup> En el síndrome que se describió en este artículo no existen granulaciones anormales en las células sanguíneas y tampoco se

ha asociado con HLH. Además, en la enfermedad de Chédiak-Higashi y en el síndrome de Griscelli no ocurre nistagmus ni estrabismo.

Una mutación de una proteína -elastasa de neutrófilos (ELANE)– se manifiesta como neutropenia severa permanente y neutropenia cíclica; al parecer es el mismo espectro de la enfermedad, es la más frecuente de las neutropenias congénitas (40 a 55%), se manifiesta con neutrófilos totales  $<0.2/\text{mm}^3$ , monocitosis, hipereosinofilia e hipergamaglobulinemia, con detención de la maduración a nivel de los promielocitos y alto riesgo de transformarse en leucemia. En la forma de neutropenia cíclica es menos severa y las neutropenias son moderadas con presentaciones cada 21 días.<sup>16</sup> Otras neutropenias asociadas con detención de la maduración de los granulocitos incluyen la mutación de HAX1 (ya descrita), WASP, neutropenia G6PC3, defecto del receptor de FSCG (CSF3P) y GFI1. En el síndrome de Wiskott-Aldrich no clásico con mutación del gen WAS con neutropenia permanente y profunda pero sin monocitosis compensatoria como en la mutación de ELANE, es muy rara y a la fecha se han descrito sólo cinco familias. También es una enfermedad con detención en la maduración de los granulocitos y ligada al cromosoma X<sup>17</sup>, como el caso de la paciente y su familia descrita en este artículo; sin embargo, no tienen el fenotipo de nistagmus, albinismo parcial y estrabismo. Las otras tres neutropenias restantes sólo comparten el defecto de la maduración de los granulocitos en la médula ósea, sin tener en común las otras características fenotípicas (manifestaciones neutropénicas heterogéneas, presentaciones extremadamente raras, asociadas con defectos genitourinarios, cardiacos, miopatías, sorderas o resistentes al factor estimulante de colonias).<sup>18-20</sup>

Por último, las neutropenias congénitas ligadas al cromosoma X, de las que ya han sido descritas la neutropenia congénita severa y mutación del gen WAS. Son diferentes sus características fenotípicas y clínicas con el caso en particular que se describe en este artículo. Muy diferente también a la enfermedad de Barth, que se manifiesta con neutropenia severa y alteraciones combinadas con cardiomiopatía dilatada, fibrosis endomiocárdica y miopatías, los pacientes presentan mutación del gen G4-5 que codifica la tafazzina, involucrada en la homeostasis de los fosfolípidos de la membrana.<sup>21</sup>

## CONCLUSIÓN

A este caso se le dio seguimiento durante toda su vida en la que se tuvo en consideración la asociación con algún síndrome descrito o desconocido. Luego de estudiarlo y analizarlo se le considera un síndrome, aún no descrito en la bibliografía médica. No es un caso aislado porque se identificó en tres miembros relacionados, con antecedentes genéticos que los ubica entre las mutaciones ligadas al cromosoma X y letalidad en varones. Ahora es importante la investigación molecular de la mutación genética para facilitar su clasificación actual como parte de las neutropenias congénitas.

## REFERENCIAS

- Dale DC, Cottle TE, Fier CJ, Bolyard AA, et al. Severe chronic neutropenia: treatment and follow-up of patients in the Severe Chronic Neutropenia International Registry. *Am J Hematol* 2003;72:82-93.
- Donadieu J, Leblanc T, Bader MB, Barkaoui M, Fenneteau O, et al. Analysis of risk factors for myelodysplasias, leukemias and death from infection among patients with congenital neutropenia. Experience of the French Severe Chronic Neutropenia Study Group. *Hematologica* 2005;90:45-53.
- Notarangelo LD, Fisher A, Geha RS, Casanova JL, Chapel H, et al. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1161-1178.
- Zeidler C, Germeshausen M, Klein C, Welte K. Clinical implications of ELA-2, HAX1 and G-CSF-receptor (CSF3R) mutations in severe congenital neutropenia. *Br J Haematol* 2009;144:459-467.
- Klein C. Congenital neutropenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009;344-50.
- Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B, Nahlaoui N, Chantelot CB. Congenital neutropenia: diagnosis, molecular bases and patient management. *Orphanet J of Rare Diseases*, review 2011;6:26.
- Monroe BL, Weinberg AG, Rosenfeld CR, Browne R. The neonatal blood count in the health and disease I. Reference values for neutrophilic cells. *J Pediatr* 1979;95:89-98.
- Schelonka RL, Yoder BA, Jardins SE, Hall RB, Butler J. Peripheral leukocyte count and leukocyte indexes in healthy newborn term infants. *J Pediatr* 1994;125:603-606.
- Schelonka RL, Yoder BA, Hall RB, Trippett TM, Louder DS, et al. Differentiation of segmented and band neutrophils during the early newborn period. *J Pediatr* 1995;127:298-300.
- Baehner RL, Johnston RB Jr. Monocyte function in children with neutropenia and chronic infections. *Blood* 1972;40:31-41.
- Kostmann R. Infantile genetic agranulocytosis; agranulocytosis infantilis hereditaria. *Acta Paediatr Suppl* 1956;45:1-78.
- Carlsson G, van 't HI, Melin M, Entesarian M, Laurencikas E, et al. Central nervous system involvement in severe congenital neutropenia: neurological and neuropsychological abnormalities associated with specific HAX1 mutations. *J Inter Med* 2008;264:368-400.
- Hermansky F, Pudlak P. Albinism Associated with Hemorrhagic Diathesis and Unusual Pigmented Reticular Cells in the Bone Marrow: Report of two Cases with Histochemical Studies. *Blood* 1959;14:162-169.
- Bohn G, Allroth A, Brandes G, Thiel G, Glocker E, et al. A novel human primary immunodeficiency syndrome caused by deficiency of the endosomal adaptor protein p14. *Nat Med* 2007;13:38-45.
- Ward DM, Shiflett SL, Kaplan J. Chédiak-Higashi syndrome: A clinical and molecular view of rare lysosomal storage disorder. *Curr Mol Med* 2002;2:469.
- Bellanne-Chantelot C, Clauin S, Leblanc T, Cassinat B, Cassinat B, et al. Mutations in the ELA2 gene correlate with more severe expression of neutropenia: a study of 81 patients from the French Neutropenia Register. *Blood* 2004;103:4119-4125.
- Ancliff PJ, Blundell MP, Cory GO, Calle Y, Worth A, et al. Two novel activating mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia. *Blood* 2006;108:2182-2189.
- Boztug K, Appaswamy G, Ashikov A, Schaffer A, Salzer U, et al. A syndrome with congenital neutropenia and mutations in G6PC3. *N Eng J Med* 2009;360:32-43.
- Druhan LJ, Ai J, Massullo P, Kindwall-Keller T, Ranalli MA, et al. Novel mechanism of G-CSF refractoriness in patients with severe congenital neutropenia. *Blood* 2005;105:584-591.
- Xia J, Bolyard AA, Rodger E, Stein S, Aprikyan AA, et al. Prevalence of mutations in ELANE, GF11, HAX1, SBDS, WAS and G6PC3 in patients with severe congenital neutropenia. *Br J Haematol* 2009;147:535-542.
- Barth PG, Wanders RJ, Vreken P, Janssen EA, Lam J, Baas F. X-linked cardioskeletal myopathy and neutropenia (Barth syndrome) (MIM 302060). *J Inherit Met Dis* 1999;22:555-567.

## El papel de la nucleofosmina (NPM1) en las neoplasias malignas mieloides

Nélida Inés Noguera,<sup>\*,\*\*,\*\*</sup> Eduardo Garza de la Peña,<sup>\*,\*\*</sup> Francesco Lo-Coco<sup>\*,\*\*</sup>

### RESUMEN

La nucleofosmina (NPM1) pertenece a la familia de chaperonas de las nucleoplasminas; es una fosfoproteína de expresión ubicua de localización fundamentalmente nucleolar, que se desplaza constantemente del núcleo al citoplasma. Se ha descrito un gran número de proteínas que interactúan con la nucleofosmina, que juega un papel relevante en diversas funciones celulares, incluidas la duplicación centrosómica, la biogénesis de los ribosomas, la respuesta al daño celular y la reparación del ADN. En pacientes con linfoma maligno no Hodgkin tipo anaplásico y en leucemia mieloide aguda se han reportado alteraciones en el gen NPM1. Las leucemias mieloides agudas con nucleofosmina mutada (también conocida como NPMc+) constituyen una entidad clínico-patológica y molecular diferente lo que ha llevado a crear un ingreso provisional para esta entidad en la clasificación de neoplasias linfo-hematopoyéticas de la OMS 2008. En esta revisión se discute el papel de la nucleofosmina en las neoplasias malignas mieloides centrándonos en: 1) su participación en la patogénesis de las leucemias mieloides agudas; 2) el diagnóstico; 3) su significado pronóstico; 4) la importancia del seguimiento de la enfermedad mínima residual y 5) la potencialidad de usar la NPMc+ como diana terapéutica.

**Palabras clave:** nucleofosmina, NPM1, nucleoplasminas, neoplasias malignas mieloides.

### ABSTRACT

Nucleophosmin (NPM1) is a ubiquitously expressed phosphoprotein that belongs to the nucleoplasmin family of chaperones. NPM1 is mainly localized in the nucleolus, and continuously shuttles between the nucleus and the cytoplasm. A high number of proteins have been described to interact with NPM1. NPM1 play a relevant role in diverse cellular functions, including, centrosome duplication, ribosome biogenesis, response to stress and ADN repair. Alterations of the *NPM1* gene have been reported in anaplastic non Hodgkin's lymphoma and acute myeloid leukemia (AML).

AML carrying nucleophosmin mutations (also referred to as NPMc+) displays distinct molecular and clinical-pathological features that led to its inclusion as a provisional entity in the 2008 WHO classification of myeloid neoplasms. Here, we discuss the role of NPM1 in myeloid malignancies focusing on i) involvement in AML pathogenesis; ii) diagnosis; iii) prognostic significance; iv) minimal residual disease monitoring and v) its potential as a target for tailored therapy.

**Key words:** Nucleophosmin, NPM1, myeloid malignancies.

\* Laboratorio de Neuro-Oncohematología, Fundación Santa Lucía, Roma, Italia.

\*\* Departamento de Biopatología, Universidad Tor Vergata, Roma, Italia.

\*\*\* Departamento de Hematología y Bioquímica Clínica, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Correspondencia: Dra. Nélida I. Noguera. Laboratorio de Neuro-Oncohematología, Fundación Santa Lucía. Vía del Fosso di Fiorano 65, Roma 00143, Italia. Correo electrónico: nelnoguera@yahoo.com.ar  
Recibido: marzo 2012. Aceptado: abril 2012.

Este artículo debe citarse como: Noguera NI, Garza de la Peña E, Lo-Coco F. El papel de la nucleofosmina (NPM1) en las neoplasias malignas mieloides. Rev Hematol Mex 2012;13(2):65-73.

www.nietoeditores.com.mx

La nucleofosmina (NPM1), también conocida como B23, numatrín o NO38 es una fosfoproteína fundamentalmente nucleolar, que trasloca del núcleo al citoplasma. Distintos estudios revelan un complejo escenario para las funciones e interacciones de la nucleofosmina, que cumple un papel proliferativo y supresor del crecimiento.<sup>1</sup> La nucleofosmina forma parte de la familia de chaperonas conocidas como nucleoplasminas y cumple una gran cantidad de funciones celulares como: 1) biogénesis y transporte de ribosomas, 2) duplicación centrosómica, 3) respuesta al daño celular y reparación del ADN.<sup>1-5</sup>



La nucleofosmina está implicada en procesos de tumorigénesis y se ha encontrado sobrepresada en tumores sólidos de diverso origen histológico (colon, hígado, ovario y próstata).<sup>6,7,8</sup> En tumores hematopoyéticos frecuentemente ocurren alteraciones genéticas que involucran el gen de la NPM1 que forman parte de las traslocaciones cromosómicas que suceden en alteraciones linfoides y mieloides, asociadas con diversas proteínas de fusión. Así la t(2;5) característica del linfoma anaplásico de células grandes, involucra los genes NPM1 y ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase).<sup>9</sup> La t(5;17), descrita en cuatro casos de leucemia aguda promielocítica (LAP), fusiona el gen NPM1 con el gen RAR $\alpha$  (Retinoic Acid Receptor  $\alpha$ ). Es posible que parte del potencial transformante de NPM-RAR $\alpha$  derive del efecto dominante negativo sobre NPM1, porque si bien todos los casos de LAP con NPM-RAR $\alpha$  tienen un alelo NPM1 normal, la NPM1 es parcialmente delocalizada al nucleoplasma debido a su interacción con NPM-RAR $\alpha$ .<sup>10</sup> Las LAP con t(5;17) presentan el fenotipo clásico de las LAP con t(15;17) y responden al tratamiento con ácido todo-trans retinoico (ATRA).<sup>11</sup>

En las leucemias mieloides agudas con t(3;5) los genes involucrados son NPM1 y MLF1 (Myeloid Leukemia Factor1), también aquí la proteína NPM1 salvaje viene deslocalizada por la proteína de fusión NPM-MLF1. En todas las proteínas de fusión, la región NH2 terminal de la nucleofosmina está conservada, aparentemente esta fracción no contribuye al potencial transformante de la proteína de fusión pero provee un dominio de dimerización fundamental para la oligomerización y la acción oncogénica de los diversos compañeros de la NPM1. Es interesante que una significativa proporción de LMA que presentan la t(3;5) con puntos de ruptura localizados fuera de NPM1 y MLF1 tengan, además, pérdida de una copia del gen NPM1 lo que indica que la haploinsuficiencia de NPM1 puede ser relevante para la leucemogénesis.<sup>12</sup>

En el año 2005 se describió una variante mutada de la proteína NPM1 que produce su deslocalización al citoplasma (NPMc+), esta mutación fue reportada en 35% de LMAs de todos los subtipos morfológicos, excepto M3, M4Eo y M7.<sup>13-16</sup> La NPMc+ se asocia con cariotipo normal (85%) y es mutuamente exclusiva con otras anomalías genéticas mayores asociadas con LMA, lo que sugiere que esta alteración representa un evento iniciador en el proceso de leucemogénesis.<sup>17</sup>

### Estructura de la nucleofosmina

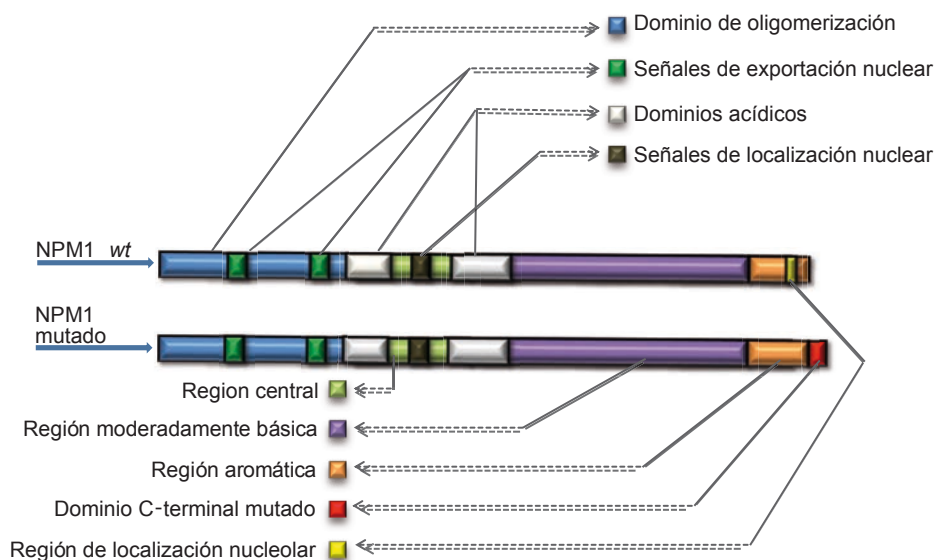
El gen de *NPM1* humano mapea en el cromosoma 5 en el locus 5q35 y está compuesto por 12 exones. Existen dos isoformas de la proteína que corresponden a *splicing* alternativos, la variante NPM1 (294 aminoácidos) se localiza a altos niveles en el nucléolo; la variante NPM1.2 (259 aminoácidos) carece de la región carboxi-terminal y en el nucleoplasma y en el citoplasma sus concentraciones son bajas.

La proteína NPM1 tiene diversos dominios estructurales, cada uno de ellos asociados con funciones específicas. La región N-terminal participa en la oligomerización y es necesaria para la función de chaperona de las proteínas. En la región central tiene dos dominios ácidos necesarios para su actividad como chaperona de histonas, con ella interviene en la modulación y ensamble de la cromatina. La región C-terminal de la nucleofosmina contiene un dominio básico con capacidad de unirse al ADN y al ARN. La NPM1 contiene, además, un motivo NES (señal de exportación nuclear) hidrofóbico rico en Leu (LxxPxxLxLx, 94-102) y dos motivos, NLS (señal de localización nuclear, 141-157) y NoLS (señal de localización nucleolar, W 288-290).<sup>18,19</sup>

La nucleofosmina sufre, además, numerosas modificaciones postranscripcionales que modulan su actividad, con numerosos sitios de fosforilación que son decisivos para su actividad en el control de la duplicación centrosómica y para la unión al ARN. Otras modificaciones que regulan la función de la NPM1 son la ubiquitinación, que induce la degradación de la misma mediante el proteasoma y la sumoilación que aumenta la estabilidad de la proteína, la acetilación y su afinidad por las histonas.<sup>20,21,22</sup>

### La NPMc+ en la patogénesis de la leucemia mieloide aguda

Aún queda por establecerse de qué forma la NPMc+ promueve la leucemogénesis; sin embargo, sin duda la deslocalización citoplasmática de la proteína mutada es un evento crítico en la patogénesis de la enfermedad. El incremento de exportación de la NPM1 al citoplasma perturba diversas vías celulares provocando pérdida o ganancia de funciones (por ejemplo, las proteínas que interactúan con NPM1 en el nucléolo se deslocalizan por la mutante al citoplasma en la célula leucémica). Además, existe la posibilidad de que la NPMc+ pueda interactuar con nuevas proteínas en el citoplasma.



**Figura 1.** Dibujo descriptivo de la isoforma 1 de NPM1 que muestra ambas variantes; wt y mutado, se señalan los sitios y regiones críticos para su función

p<sup>14</sup>Arf es una proteína nucleolar capaz de arrestar el ciclo celular, fundamentalmente a través de la inhibición y degradación de p53 mediada por Hdm2, también es capaz de inhibir el ciclo celular de manera independiente de p53 (23, 24). La NPMc+ deslocaliza a p<sup>14</sup>Arf en el citoplasma, afectando su estabilidad y función.<sup>23,24</sup>

c-Myc es una proteína oncogénica con una participación importante en la progresión del ciclo celular, apoptosis y transformación celular. Fbw7 es la E3 ubiquitin ligasa involucrada en su degradación. NPMc+ interacciona de forma directa con Fbw7 deslocalizándola al citoplasma y favoreciendo su degradación, como consecuencia las concentraciones de c-Myc aumentan.<sup>25</sup> En modelos de ratón se ha demostrado que las concentraciones elevadas de c-Myc favorecen la leucemogénesis.<sup>26</sup> NPMc+ también coopera con E1A, que ejerce su actividad transformante a través de la inactivación del oncosupresor pRB, lo que sugiere que NPMc+ puede actuar activando de manera indirecta la vía del Rb.<sup>27</sup>

Miz1 es un factor de transcripción que activa la expresión de dos importantes inhibidores del ciclo celular, p15Ink4b y p21. NPMc+ deslocaliza a Miz1 en el citoplasma, favoreciendo la progresión descontrolada del ciclo celular.<sup>28</sup>

La función de la NPM1 está profundamente afectada por su reducción en el nucléolo. La reducción de NPM1

en éste se debe no sólo a la heterocigosis sino también a su deslocalización en el citoplasma a través de la formación de heterodímeros con NPMc+.<sup>29</sup> En ratones knock-out para NPM1, la inactivación de NPM1 conduce a inestabilidad genómica, lo que promueve susceptibilidad *in vivo* e *in vitro* al cáncer. Los ratones NPM1± forman tumores espontáneos, sobre todo de estirpe mieloides.<sup>30</sup>

Sin embargo, hasta ahora no ha podido demostrarse que la NPM1 mutada por sí sola sea capaz de iniciar una LMA. Es probable que para ejercer su efecto oncogénico NPMc+ necesite condiciones diferentes a las que se han estudiado hasta el momento, así como un precursor mieloides específico, o alcanzar una relación de expresión mutante-salvaje determinada para producir la deslocalización al citoplasma de ambas formas, o acompañarse de un evento secundario. Sin duda, será necesario realizar diversos estudios que permitan esclarecer esta situación.

#### Diagnóstico de NPMc+ en leucemia mieloides aguda

Se han identificado alrededor de 50 variantes moleculares de NPMc+.<sup>31</sup> Casi siempre se localizan en el exón 12, pero también se las encuentra en el exón 11.<sup>32</sup> Las mutaciones de NPM1 se detectan en alrededor de 25 a 35% de todas las LMA,<sup>9,13</sup> pero sólo en 6.5 a 8.4 % de pacientes pediátricos

con LMA.<sup>33,34</sup> La mutación NPM1 tipo A, que consiste en una inserción de cuatro pares de bases TCTG, es la más frecuente en adultos (75 a 80% de los casos) mientras en los niños predominan otras variantes.<sup>35</sup>

Desde que se identificó la mutación de la nucleofosmina, se desarrolló una gran cantidad de métodos para su estudio (Cuadro 1). En la actualidad se han realizado ensayos moleculares altamente sensibles y específicos. Uno de los más utilizados es el análisis de fragmentos que tiene la ventaja de analizar de manera simultánea alteraciones en los genes *fms-related tyrosine kinase 3 (FLT3)* o *CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  (CEBPA)*.<sup>36,37</sup> Estos métodos no discriminan la mutación A de las demás variantes y las muestras positivas deben someterse a análisis de secuenciación para su caracterización detallada. Existe otro ensayo que se basa en el uso de la curva de temperatura de *melting*, este método incluye el uso de sondas específicas lo que permite discriminar entre las variantes A, B y D.<sup>38</sup>

Para el estudio de la enfermedad mínima residual se han desarrollado métodos más sensibles; el más utilizado es con PCR cuantitativa o PCR en tiempo real.<sup>39,40</sup> En centros que no cuentan con el instrumental apropiado existe la posibilidad de trabajar con PCR en *heminested* y realizar la corrida electroforética en gel de agar. Este método es específico para la mutación A<sup>41</sup> o realizar la corrida en gel

de poliacrilamida que permite individualizar cualquiera de las variantes del exón 12.<sup>42</sup>

### Significado clínico de NPMc+ en la leucemia mieloide aguda

En estudios recientes de clasificación pronóstica en LMA de cariotipo normal se ha evidenciado que aproximadamente en 45% de los casos es posible identificar una o varias mutaciones, permitiéndose con esto la estratificación en grupos moleculares de pronóstico favorable o adverso.<sup>43</sup>

Mediante análisis genómico con el auxilio de técnicas moleculares se ha encontrado una gran cantidad de mutaciones nuevas en pacientes diagnosticados con LMA y cariotipo normal, mutaciones que pueden o no coexistir con NPM1 mutado, tales como; *FLT3 internal tandem duplications (ITD)* o *mutations of the tyrosine kinase domain (TKD)*, *partial tandem duplications (PTD)* del gen *mixed myeloid-lymphoid or mixed lineage leukemia (MLL)*, así como las mutaciones del gen homólogo del oncogen viral de neuroblastoma (*NRAS*), *CEBPA*, mutación 1 del gen del tumor de Wilms (*WT1*), gen *brain and acute leukemia cytoplasmic (BAALC)*, gen *ETS-related (ERG)*, el oncogen *v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (c-KIT)*, *isocitrate*

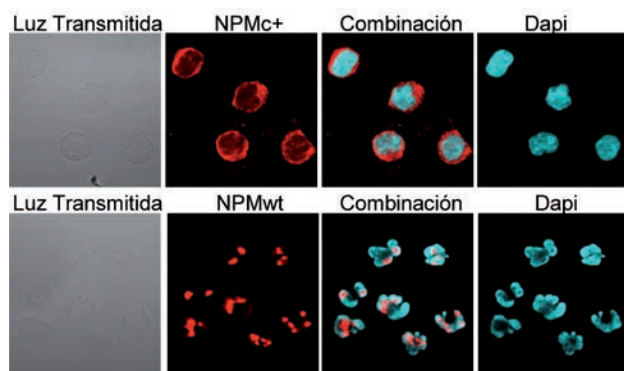
**Cuadro 1.** Métodos para el diagnóstico de las mutaciones del gen *NPM1*

	Sensibilidad	Ventaja	Desventaja	Aplicación
<i>Secuenciación</i>	0.2	Identifica con precisión el tipo de mutación	Baja sensibilidad, costoso	<i>Tamizaje</i> diagnóstico
<i>*DHPLC</i>	10 <sup>-2</sup>	Detecta todas las mutaciones	Requiere instrumental costoso	<i>Tamizaje</i> diagnóstico
<i>**ASO-RT-PCR</i>	10 <sup>-2</sup>	Económico, instrumental de baja complejidad	Detecta sólo la mutación A	<i>Tamizaje</i> diagnóstico y EMR (mutación específica)
<i>Semi-nested-ASO-PCR</i>	10 <sup>-4</sup>	Económico	Detecta sólo la mutación A	<i>Tamizaje</i> diagnóstico
<i>***HRM</i>	10 <sup>-4</sup> - 10 <sup>-5</sup>	Detecta todas las mutaciones y permite saber el número de copias	Requiere instrumental costoso	<i>Tamizaje</i> diagnóstico
<i>RT-PCR y electroforesis en poliacrilamida</i>	10 <sup>-4</sup>	Económico, instrumental de baja complejidad	Es necesario trabajar con poliacrilamida	<i>Tamizaje</i> diagnóstico y EMR
<i>Electroforesis capilar</i>	10 <sup>-2</sup> - 10 <sup>-3</sup>	Detecta todas las mutaciones	Requiere instrumental costoso	<i>Tamizaje</i> diagnóstico
<i>PCR cuantitativa</i>	10 <sup>-4</sup> - 10 <sup>-6</sup>	Identifica todas las mutaciones y permite saber el número de copias	Requiere instrumental costoso	<i>Tamizaje</i> diagnóstico y EMR (mutación específica)

*\*DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography);*

*\*\*ASO (allele-specific oligonucleotide), RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction)*

*\*\*\*HRM: (High-resolution melting curve analysis).*



**Figura 2.** Localización citoplasmática de NPMc+ en un paciente con LMA; y localización nucleolar de NPM1 salvaje (NPMwt) en la línea celular OCI-AML2

*dehydrogenase 1 y 2 (IDH1 e IDH2), DNA(cytosine-5)-methyltransferase 3 beta (DNMT3)* entre otros. Como se mencionó, es posible identificar distintos subgrupos de sujetos con una o varias de estas alteraciones que cuentan con diversos significados pronósticos e implicaciones terapéuticas. De las mutaciones más frecuentes, las descritas en el exón 12 del gen NPM1 se presentan en 25% de los casos de LMA *de novo* y en 50% de los casos de LMA con cariotipo normal.<sup>9</sup> En relación con el pronóstico, en la bibliografía se reporta que tienen un impacto favorable en adultos y niños.<sup>33</sup> En cuanto al tratamiento, se estima que 70% de los sujetos con LMA de cariotipo normal, mutaciones en NPM1 positiva, FLT3-ITD negativa (FLT3 de tipo salvaje) y concentraciones bajas del gen ERG, logran hasta dos años de supervivencia libre de progresión de la enfermedad después del tratamiento de inducción con citarabina, daunorrubicina y etopósido, seguido de citarabina en altas dosis o trasplante hematopoyético autólogo posterior a la quimioterapia de intensificación.<sup>44</sup> En otro estudio, 60% de los pacientes con características similares lograron cuatro años de supervivencia general.<sup>45</sup>

Con base en la clasificación de la OMS 2008, la evidencia actual en referencia a las nuevas clasificaciones citogenéticas y moleculares para LMA con implicaciones clínicas, de estratificación del riesgo, pronósticas y terapéuticas se ha hecho hincapié en la identificación de las mutaciones del gen NPM1 en presencia o ausencia de mutaciones del gen FLT3, tanto que se ha propuesto un ingreso provisional para este grupo particular en la clasificación de neoplasias linfo-hematopoyéticas.

En la actualidad, el mecanismo de quimiosensibilidad para las LMAs con mutaciones en NPM1 no ha sido esclarecido totalmente; sin embargo, se sabe que la coexistencia de mutaciones en FLT3-ITD repercute en el significado pronóstico haciéndolo menos favorable, como se demostró en los estudios clínicos prospectivos del Medical Research Council (MRC, Reino Unido) donde en una cohorte de 215 adultos jóvenes diagnosticados con LMA de cariotipo normal con mutaciones de FLT3-ITD y NPM1 de tipo salvaje (NPM1-salvaje) tuvo un mal pronóstico (13% vivos a 10 años), mientras que la cohorte de pacientes con mutaciones en NPM1 y FLT3-salvaje registró una tasa de supervivencia muy superior (50% vivos a 10 años).<sup>9,46-49</sup> De igual forma, los pacientes mayores con mutaciones en NPM1 tienen mejor pronóstico.<sup>50</sup> Los pacientes con mutaciones en NPM1 y FLT3-ITD tienen la peor respuesta a la terapia de inducción (63% en comparación con 86% de quienes tienen NPM1 mutado y FLT3-ITD negativo); sin embargo, la supervivencia general de este grupo a cinco años es menor de 30% a diferencia del grupo con mutación de NPM1 y FLT3-ITD negativo cuyo porcentaje es de aproximadamente 60%.<sup>51</sup> Con intención de definir el mecanismo por el que las mutaciones en NPM1 y FLT3 afectan el pronóstico de los pacientes con LMA se han formulado hipótesis centradas en la interacción de estas proteínas con p53, donde se ha visto que ante mutaciones en NPM1 existe un predominio en la expresión de las isoformas  $\beta$  y  $\gamma$  de p53 asociadas con mejor respuesta a las antraciclina y citarabina en comparación con las mutaciones FLT3-ITD donde predomina la expresión de la isoforma p53 de tamaño completo, que promueve la resistencia al tratamiento.<sup>52</sup>

En estudios más recientes sobre el binomio NPM1-FLT3 en pacientes con LMA de novo, con cariotipo normal, se ha observado que el porcentaje de blastos en médula ósea al momento del diagnóstico está ligado al estado mutacional de ambos genes, en donde los pacientes con un alto porcentaje de blastos presentan mutaciones en NPM1 y FLT3-ITD comparado con quienes tienen menor porcentaje de blastos donde ambos genes son normales.<sup>49</sup> Más aún, en estudios donde se ha cuantificado la expresión del ARNm de FLT3-ITD en pacientes con LMA de cariotipo normal se ha observado que mientras más alto es el nivel de expresión de FLT3-ITD peor es el pronóstico comparado con los casos donde la expresión es baja.

Si se toma en cuenta que aproximadamente 80% de las mutaciones del exón 12 de NPM1 son del tipo A, resulta poco claro el significado pronóstico del 20% restante en presencia y ausencia de FLT3 mutado. Con respecto a las mutaciones no A de NPM1, dado al bajo número de casos estudiados, es difícil precisar si existen diferencias en el pronóstico comparándolas con las mutaciones tipo A.

Las características distintivas de LMA con *NPM1* mutado se describen en el Cuadro 2.

### **NPMc+ como diana en el tratamiento en la leucemia mieloide aguda**

En diversas publicaciones se ha descrito que los pacientes con LMA y cariotipo normal, con mutaciones en NPM1, tienen mejor respuesta al tratamiento convencional con agentes quimioterapéuticos. El enfoque de un tratamiento dirigido hacia NPM1 en estos pacientes se estudia actualmente explorando distintas estrategias: interferencia con el transporte del mutante leucémico de NPM1, inhibición de la capacidad funcional residual de NPM1 salvaje y otros componentes nucleolares y la intervención en la enfermedad mínima residual (copias de los transcritos de NPM1 mutante) antes de que ocurra la recaída hematológica (terapia de pre-vaciamiento).<sup>48</sup> Desde el punto de vista molecular, las células leucémicas con mutación de NPM1 presentan la proteína NPMc+ deslocalizada de su origen nucleolar. Con base en este hecho se ha reportado que algunos agentes quimioterapéuticos, como la actinomicina D, daunorrubicina, 5-fluoroacilo y camptotecina alteran la estructura nucleolar deslocalizando a la nucleofosmina; éste es un evento que precede a la apoptosis. En el caso de la daunorrubicina se ha demostrado en estudios que la

translocación de la nucleofosmina del nucléolo al nucleoplasma es proporcional al incremento en la dosis.<sup>39</sup>

Otros agentes anticáncer, como el CIG-300, se han desarrollado con la finalidad de interferir en el ensamblaje nucleolar de NPM1 al inhibir su fosforilación consiguiendo la inducción de apoptosis.<sup>53</sup> En vista de que se ha reportado una expresión aumentada de CD33 en el inmunofenotipo de los pacientes portadores de LMA con mutaciones de NPM1, se han estudiado anticuerpos monoclonales anti-CD33 como el gemtuzumab ozogamicina con el que se consiguen resultados prometedores.<sup>54</sup>

### **NPM1 y mielodisplasia**

El rol de la nucleofosmina se ha estudiado en modelos murinos “*knock out*” para *NPM1* donde se encontró que los ratones *NPM1<sup>-/-</sup>* presentan características hematológicas similares a las encontradas en los síndromes mielodisplásicos (SMD), como diseritropoiesis y dismegacariopoesis, además la inactivación de *NPM1* conlleva a la duplicación del centrosoma sin restricción y a la inestabilidad genómica.<sup>55</sup>

Además de las mutaciones, se han observado otras anomalías de NPM1 en relación con el estado de haploinsuficiencia. El gen *NPM1* se localiza en el cromosoma 5 región q35, en donde se ha identificado la haploinsuficiencia en casos de SMD con deleciones en el cromosoma 5q. En estudios hechos en pacientes con síndrome 5q- aislada no se ha detectado haploinsuficiencia ni mutación de *NPM1*, lo contrario a los casos de SMD con del(5q) y cariotipo complejo donde se han detectado microdeleciones teloméricas que involucran la región 5q35 que provoca el estado de haploinsuficiencia.<sup>56,57,58</sup>

#### **Cuadro 2.** Características de las mutaciones en el gen *NPM1*

##### **Características genéticas de las mutaciones en NPM1**

Aparecen *de novo* y son muy estables en las células leucémicas y están presentes en las células tallo.

Contienen perfiles particulares de expresión génica y de microARN.

Otras alteraciones como, FLT3-ITD, ocurren después que se presentan las mutaciones en NPM1.

##### **Características clínicas y biológicas de las mutaciones en NPM1**

La frecuencia es menor en niños, y mayor en mujeres.

Las características inmunofenotípicas son particulares, porque existe una expresión aumentada de CD33 con disminución de la expresión de CD34 en las células leucémicas, siendo más frecuentes en LMA tipo M4 y M5.

En cuanto a la citogenética, cerca de 85% de los casos de LMA con mutaciones en NPM1 no tienen alteraciones.

Los pacientes con mutaciones en NPM1 sin alteraciones en el gen FLT3 tienen excelente respuesta a la terapia de inducción en comparación con quienes no tienen la mutación, y también pronóstico más favorable.



En otras investigaciones se ha reportado que la delección de *NPM1* ocurre en 40% de los casos de SMD/LMA de alto riesgo con cariotipo complejo y pérdida de 5q.<sup>59</sup> Se ha descrito que los pacientes con tales características tienen peor pronóstico y mayor riesgo de LMA.<sup>56</sup>

Fuera de los genes haploinsuficientes que se pierden en las regiones que comúnmente sufren pérdida (5q31 a 5q33) existen otros genes importantes a los que se les ha atribuido un papel en el desarrollo de la mielodisplasia, de entre más de 100 genes que permanecen en las regiones de 5q que comúnmente no sufren pérdida, los genes *APC* y *NPM1* son los que se han estudiado con mayor profundidad. Con respecto a *NPM1*, se han investigado los niveles de expresión génica en pacientes que padecen SMD con y sin del(5q), donde se observó que existe disminución en la expresión de *NPM1* sólo en el grupo de casos con del(5q) de los que tienen anemia resistente con exceso de blastos 1 y 2 fueron los que mostraron la expresión más baja de todos los casos estudiados. Con respecto a los casos de SMD sin del(5q) se observó que los niveles de expresión de *NPM1* son similares a los vistos en personas sanas.<sup>60</sup>

Para buscar alguna causa de la disminución en la expresión de *NPM1* vista en los casos de SMD con del(5q) resultaría necesario investigar en detalle los sitios de ruptura de *NPM1* mediante el uso de sondas fluorescentes (p. ej. *Bacterial Artificial Chromosome* BAC) y así evidenciar si existen o no micropérdidas crípticas que no son detectadas por las técnicas citogenéticas convencionales estableciéndose una relación de la haploinsuficiencia de *NPM1* con este tipo de SMD.

### **NPM1: perspectivas**

En la actualidad se sigue investigando la función de *NPM1* con el fin de ligar mecanismos biológicos que expliquen su papel en condiciones normales y patológicas, con esto se pretende avanzar en el desarrollo de herramientas diagnósticas y farmacológicas para el tratamiento de pacientes con enfermedades hematológicas.

Desde el punto de vista diagnóstico, la identificación de *NPM1* mutado mediante métodos moleculares continúa siendo un área importante de investigación. Trabajos recientes reportan que la cuantificación de copias de transcritos de *NPM1* por PCR en tiempo real permite determinar la enfermedad mínima residual o la recidiva.<sup>61</sup> La práctica de la cuantificación de *NPM1* mutado aunada a un seguimiento clínico estrecho ofrece la posibilidad de modular las

intervenciones terapéuticas ajustando los agentes quimioterapéuticos, las dosis y la duración del tratamiento.

En cuanto al tratamiento, los datos reportados hasta el presente sostienen la idea que *NPM1* puede ser un importante diana terapéutica, si bien dada la similitud existente entre *NPMc+* y *NPM1* salvaje será difícil diseñar una molécula que afecte de manera específica solo a la proteína mutada.

También sigue estudiándose el efecto de los medicamentos en el pronóstico de los pacientes con LMA y mutaciones en *NPM1*. Recientemente se publicó que en pacientes entre 17 y 60 años de edad con LMA existe un aumento en la supervivencia general a tres años cuando son sometidos a terapia de inducción con dosis de 90 mg/m<sup>2</sup> de daunorrubicina en presencia de mutaciones en los genes *NPM1*, *DNMT3A* o translocaciones *MLL* en comparación con los que son tratados con dosis de 45 mg/m<sup>2</sup> del mismo fármaco (44% vs 25%).<sup>62</sup>

En conclusión, queda aún mucho por aprender en el horizonte de las mielopatías malignas y su comportamiento biológico. En el caso de las alteraciones de *NPM1*, éstas seguirán cobrando un papel importante en LMA y SMD, por tal motivo hoy en día resulta importante en la práctica clínica contar con las herramientas necesarias para integrar el estado mutacional del binomio *NPM1-FLT3* como parte del diagnóstico clínico y clasificación de la enfermedad. Asimismo, la cuantificación de las mutaciones de *NPM1* será de gran utilidad para mejorar la evaluación de la respuesta al tratamiento y dosificar de modo más racional el seguimiento de la terapia en las LMA *NPMc+*.

### **REFERENCIAS**

1. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:493-505
2. Ruggero D, Pandolfi PP. Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer* 2003;3:179-192
3. Ye K. Nucleophosmin/B23, a multifunctional protein that can regulate apoptosis. *Cancer Biol Ther* 2005;4(9):918-23.
4. Colombo E, Martinelli P, Zamponi R, Shing DC, Bonetti P, Luzi L, et al. Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the leukemia-associated NPM mutant. *Cancer Res* 2006; 66(6):3044-50.
5. Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK, et al. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 2000;103(1):127-40.
6. Tanaka M, Sasaki H, Kino I, Sugimura T, Terada M. Genes preferentially expressed in embryo stomach are predominantly expressed in gastric cancer. *Cancer Res* 1992;52(12):3372-7.

7. Nozawa Y, Van Belzen N, Van der Made AC, Dinjens WN, Bosman FT. Expression of nucleophosmin/B23 in normal and neoplastic colorectal mucosa. *J Pathol* 1996;178(1):48-52.
8. Bernard K, Litman E, Fitzpatrick JL, Shellman YG, Argast G, Polvinen K, et al. Functional proteomic analysis of melanoma progression. *Cancer Res* 2003;63(20):6716-25
9. Falini B, Nicoletti I, Bolli N, Martelli MP, Liso A, Gorello P, et al. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica* 2007;92(4):519-32. Review.
10. Meani N, Alcalay M. Role of nucleophosmin in acute myeloid leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009;(9):1283-94.
11. Okazuka K, Masuko M, Seki Y, Hama H, Honma N, Furukawa T, et al. Successful all-trans retinoic acid treatment of acute promyelocytic leukemia in a patient with NPM/RAR fusion. *Int J Hematol* 2007;86(3):246-249.
12. Sportoletti P, Grisendi S, Majid SM, Cheng K, Clohessy JG, et al. Npm1 is a haploinsufficient suppressor of myeloid and lymphoid malignancies in the mouse. *Blood* 2008;111(7):3859-3862.
13. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, et al. Cytoplasmic Nucleophosmin (NPM) Identifies a Subtype of Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype and NPM1 Gene Mutations. *New Engl Med* 2005;352:254-266.
14. Falini B, Mecucci C, Saglio G, Lo Coco F, Diverio D, et al. NPM1 mutations and cytoplasmic nucleophosmin are mutually exclusive of recurrent genetic abnormalities: a comparative analysis of 2562 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2008;93(3):439-442.
15. Braoudaki M, Papatthanassiou C, Katsibardi K, Tourkadoni N, Karamolegou K, et al. The frequency of NPM1 mutations in childhood acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 2010;3:41
16. Falini B. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): molecular, pathological, and clinical features. *Cancer Treat Res* 2010;145:149-168.
17. Falini B, Martelli MP, Bolli N, Sportoletti P, Liso A, Tiacci E, et al. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity? *Blood* 2011;117(4):1109-1120.
18. Okuwaki M. The structure and functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein. *J Biochem* 2008;143(4):441-448.
19. Hingorani K, Szebeni A, Olson MO. Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J Biol Chem* 2000;275(32):24451-24457.
20. Tokuyama Y, Horn HF, Kawamura K, Tarapore P, Fukasawa K. Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. *J Biol Chem* 2001; 276(24):21529-21537.
21. Liu X, Liu Z, Jang SW, Shinmura K, Kang S, Dong S, et al. Sumoylation of nucleophosmin/B23 regulates its subcellular localization, mediating cell proliferation and survival. *Proc Natl Acad Sci US A*. 2007; 104(23):9679-9684.
22. Shandilya J, Swaminathan V, Gadad SS, Choudhari R, Kodaganur GS, Kundu TK. Acetylated NPM1 localizes in the nucleoplasm and regulates transcriptional activation of genes implicated in oral cancer manifestation. *Mol Cell Biol* 2009;18:5115-5127.
23. Weber JD, Jeffers JR, Rehg JE, Randle DH, Lozano G, Roussel MF, et al. p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* 2000;14:2358-65.
24. Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1999;1: 20-6.
25. Bonetti P, Davoli T, Sironi C, Amati B, Pelicci PG, Colombo E. Nucleophosmin and its AML-associated mutant regulate c-Myc turnover through Fbw7 gamma. *J Cell Biol* 2008;182(1):19-26.
26. Luo H, Q Li J, O' Neal, Kreisel F, Le Beau MM, Tomasson MH. c-Myc rapidly induces acute myeloid leukemia in mice without evidence of lymphoma-associated antiapoptotic mutations. *Blood* 2005;106:2452-2461.
27. Cheng K, Grisendi S, Clohessy JG, Majid S, Bernardi R, et al. The leukemia-associated cytoplasmic nucleophosmin mutant is an oncogene with paradoxical functions: Arf inactivation and induction of cellular senescence. *Oncogene* 2007;26:7391-400.
28. Wanzel M, Russ AC, Kleine-Kohlbrecher D, Colombo E, Pelicci PG, Eilers M. A ribosomal protein L23-nucleophosmin circuit coordinates Miz1 function with cell growth. *Nat Cell Biol* 2008;10:1051-1061.
29. Falini B, Bolli N, Liso A, Martelli MP, Mannucci R, Pileri S, et al. Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications. *Leukemia* 2009;23(10):1731-1743.
30. Sportoletti P, Grisendi S, Majid SM, Cheng K, Clohessy JG, Viale A, et al. Npm1 is a haploinsufficient suppressor of myeloid and lymphoid malignancies in the mouse. *Blood* 2008;111(7):3859-3862.
31. Rau R, Brown P. Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukaemia: towards definition of a new leukaemia entity. *Hematol Oncol* 2009;27(4):171-181.
32. Albiero E, Madeo D, Bolli N, Giaretta I, Bona ED, Martelli MF, et al. Identification and functional characterization of a cytoplasmic nucleophosmin leukaemic mutant generated by a novel exon-11 NPM mutation. *Leukemia* 2007;21(5):1099-1103.
33. Brown P, McIntyre E, Rau R, Meshinchi S, Lacayo N, Dahl G, et al. The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML *Blood* 2007;110(3):979-985.
34. Hollink IH, Zwaan CM, Zimmermann M, Arentsen-Peters TC, Pieters R, Cloos J, et al. Favorable prognostic impact of NPM1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia, with emphasis on cytogenetically normal AML. *Leukemia* 2009;23(2):262-270.
35. Thiede C, Creutzig E, Reinhardt D, Ehninger G, Creutzig U. Different types of NPM1 mutations in children and adults: evidence for an effect of patient age on the prevalence of the TCTG-tandem duplication in NPM1-exon 12. *Leukemia* 2007;21(2):366-367.
36. Noguera NI, Ammatuna E, Zangrilli D, Lavorgna S, Divona M, Buccisano F, et al. Simultaneous detection of NPM1 and FLT3-ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia *Leukemia* 2005;19(8):1479-82. Erratum in: *Leukemia*. 2007 May;21(5):1134.
37. Lin LI, Lin TC, Chou WC, Tang JL, Lin DT, Tien HF. A novel fluorescence-based multiplex PCR assay for rapid simultaneous detection of CEBPA mutations and NPM mutations in patients with acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2006;20(10):1899-1903
38. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*. 2005;106(12):3733-3739.

39. B. Falini, Gionfriddo I, Cecchetti F, Ballanti S, Pettirossi V, Martelli MP. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): any hope for a targeted therapy? *Blood Reviews* 2011;25:247-257.
40. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, Dell'Oro MG, Gottardi E, Specchia G, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia* 2006;20(6):1103-1108.
41. Ottone T, Ammatuna E, Lavorgna S, Noguera NI, Buccisano F, Venditti A, et al. Lo-Coco F. An allele-specific rt-PCR assay to detect type A mutation of the nucleophosmin-1 gene in acute myeloid leukemia. *J Mol Diagn.* 2008;10(3):212-6.
42. Calvo KL, Ojeda MJ, Ammatuna E, Lavorgna S, Ottone T, Targovnik HM, et al. Detection of the nucleophosmin gene mutations in acute myelogenous leukemia through RT-PCR and polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur J Haematol.* 2009;82(1):69-72.
43. Santamaría CM, Chillón MC, García-Sanz R, Pérez C, Caballero MD, Ramos F, et al. Molecular stratification model for prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 2009;114:148
44. Marcucci G, Maharry K, Whitman SP, Vukosavljevic T, Paschka P, Langer C, et al. High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 2007;25(22):3337-43.
45. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008;358(18):1909-18.
46. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010;116(3):354-65.
47. Schneider F, Hoster E, Unterhalt M, Schneider S, Dufour A, Benthaus T, et al. The FLT3ITD mRNA level has a high prognostic impact in NPM1 mutated, but not in NPM1 unmutated AML with a normal karyotype. *Blood* 2012;Feb 28, Epub.
48. Sockel K, Wermke M, Radke J, Kiani A, Schaich M, Bornhäuser M, et al. Minimal residual disease-directed preemptive treatment with azacitidine in patients with NPM1-mutant acute myeloid leukemia and molecular relapse. *Haematologica* 2011;96(10):1568-70. Epub 2011 Jul 12.
49. Haferlach T, Bacher U, Alpermann T, Haferlach C, Kern W, Schnittger S. Amount of bone marrow blasts is strongly correlated to NPM1 and FLT3-ITD mutation rate in AML with normal karyotype. *Leukemia Research* 2012;36:51-58
50. Becker H, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, et al. Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2010;28(4):596
51. Döhner Konstanze, Schlenk FS, Habdank M, Scholl C, Rücker FG, Corbacioglu A, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 2005;106(12):3740-3748.
52. Anensen N, Hjelle SM, Van Belle W, Haaland I, Silden E, Bourdon JC, et al. Correlation analysis of p53 protein isoforms with NPM1/FLT3 mutations and therapy response in acute myeloid leukemia. *Oncogene* 2011:1-13 online publication.
53. Perera Y, Farina HG, Gil G. Anticancer peptide CIGB-300 binds to nucleophosmin/B23, impairs its CK2-mediated phosphorylation, and leads to apoptosis through its nucleolar disassembly activity. *Mol Cancer Ther* 2009;8:1189-1196.
54. Chevallier P, Prebet T, Pigneux A, Hunault M, Delaunay J, Perry F, et al. Influence of NPM1 and FLT3-ITD status on outcome in relapsed/refractory AML patients receiving salvage therapy including gemtuzumab ozogamicin. *Leukemia* 2010;24:467-469.
55. Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, Cheng K, Khandker L, Manova K, et al. Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature* 2005;437:147-153.
56. Ebert B. Molecular Dissection of the 5q Deletion in Myelodysplastic Syndrome. *Seminars in Oncology* 2011;38(5):621-626.
57. Ammatuna E, Panetta P, Agirre X, Ottone T, Lavorgna S, Calasanz MJ, et al. NPM1 gene deletions in myelodysplastic syndromes with 5q- and complex karyotype. *Haematologica* 2011;96(5):784-785.
58. Douet-Guilbert N, De Braekeleer E, Basinko A, Guéganic N, Bovo C, Le Bris MJ, et al. Molecular characterization of deletions of the long arm of chromosome 5 (del(5q)) in 94 MDS/AML patient. *Leukemia* 2012;1-3 online publication.
59. La Starza R, Matteucci C, Gorello P, Brandimarte L, Pierini V, Crescenzi B, et al. NPM1 deletion is associated with gross chromosomal rearrangement in leukemia. *PLoS ONE* 2010; 5(9):e12855.
60. Pellagati A, Cazzola M, Giagounidis A, Perry J, Malcovati L, Della Porta MG, et al. Marked down-regulation of nucleophosmin-1 is associated with advanced del(5q) myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2011;155:272-274.
61. Bakarati F, Luthra R, Yin C, Barkoh BA, Hai S, Jamil W, et al. Detection of Nucleophosmin 1 Mutations by Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction versus Capillary Electrophoresis. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:994-1000.
62. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, et al. Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2012;366(12):1079-89.

## Utilidad del trasplante de células hematopoyéticas en la leucemia mieloide aguda

David Gómez-Almaguer, Juan Antonio Flores-Jiménez, Olga Cantú-Rodríguez, César Homero Gutiérrez-Aguirre

### RESUMEN

El trasplante de células hematopoyéticas en sus diversas modalidades se ha utilizado como tratamiento de la leucemia mieloide aguda, sobre todo en pacientes en recaída leucémica. Hoy en día diferentes marcadores citogenéticos y moleculares han permitido orientar el tratamiento de cada paciente en forma individualizada. De esta manera es posible evaluar el riesgo y con ello el pronóstico de dicho paciente. La supervivencia a largo plazo sigue siendo un reto para el clínico con números no muy alentadores para países como el nuestro. La adición de medicamentos, como el ácido holo-transretinoico a esquemas de quimioterapia ha demostrado una excelente respuesta y tasas de curación en la leucemia promielocítica. La combinación de citotoxicidad y efecto de injerto *versus* leucemia han permitido al trasplante de células hematopoyéticas consolidarse como un recurso terapéutico importante, siempre orientado por variables como la edad y condición clínica del paciente, grupo de riesgo y disponibilidad de donador compatible.

**Palabras clave:** leucemia mieloide aguda, trasplante de células hematopoyéticas, marcadores citogenéticos.

### ABSTRACT

Hematopoietic stem cell transplantation in its various forms has been used as a treatment for acute myeloid leukemia principally as rescue in relapsed leukemia. Today different cytogenetic and molecular markers have allowed guide treatment for each patient in a more individualized manner. In this way it is possible to assess the risk and thus the prognosis of the patient. The long-term survival remains a challenge for clinicians with not very encouraging numbers for developing countries. The addition of medications such as all-trans retinoic acid to chemotherapy regimens has demonstrated an excellent response and cure rates in promyelocytic leukemia. The combination of cytotoxicity and graft versus leukemia effect has allowed hematopoietic stem cell transplantation to be considered as an important therapeutic resource always guided by variables such as age, clinical condition, risk group and matched donor availability.

**Key words:** acute myeloid leukemia, hematopoietic stem cell transplantation, cytogenetics.

La leucemia mieloblástica aguda es una enfermedad clonal de las células hematopoyéticas que han perdido la capacidad de responder a los mecanismos que regulan la proliferación celular. En las últimas dos décadas se ha observado mejoría importante en el pronóstico de los pacientes con leucemia mieloblástica aguda, esto puede ser explicado por diferentes factores, entre otros la aparición de

tratamientos específicos como el ácido holo-transretinoico en la leucemia promielocítica aguda, mejor técnica para el trasplante de células hematopoyéticas, advenimiento de los trasplantes de intensidad reducida y, por supuesto, a la mayor facilidad de acceso a la terapia de apoyo o soporte de medicina transfusional, además de la aparición de nuevos y mejores antibióticos, antimicóticos, antivirales, etc.

Un estudio reciente demostró que en los países desarrollados la supervivencia a cinco años del diagnóstico aumentó en pacientes jóvenes, siendo del orden de 52.3% en población entre 15 y 34 años (años 2000-2004).<sup>1</sup> Sin embargo, a pesar de estos avances el índice de remisión inicial es de 70% en adultos jóvenes, 50% en adultos de mediana edad y sólo de 25% en adultos mayores.<sup>2</sup>

La leucemia mieloblástica aguda puede clasificarse morfológicamente con histoquímica y por citometría de flujo. Se reconocen los ocho grupos clásicos de la clasificación franco-américo-británica (FAB) que van del M0 a

Servicio de Hematología. Hospital Universitario Dr. José E. González, Monterrey, NL. México.

Correspondencia: Dr. David Gómez Almaguer. Madero y Gonzalitos sin número. Colonia Centro. Monterrey 64460, Nuevo León. Correo electrónico: ramonmartinezfm@hotmail.com

Este artículo debe citarse como: Gómez-Almaguer D, Flores-Jiménez JA, Cantú-Rodríguez O, Gutiérrez-Aguirre CH. Utilidad del trasplante de células hematopoyéticas en la leucemia mieloide aguda. Rev Hematol Mex 2012;13(2):74-79.

www.nietoeditores.com.mx



M7.<sup>3</sup> Para propósitos de riesgo existen diversos factores de mal pronóstico, como mayor edad del paciente, cifra elevada de leucocitos al diagnóstico, leucemia secundaria a un síndrome mielodisplásico o tratamiento citotóxico para otra neoplasia, falta de respuesta con el primer ciclo de quimioterapia, etc.<sup>4</sup> Sin embargo, en la actualidad se utiliza más frecuentemente la clasificación citogenética, que es más precisa si se combina con la información molecular.<sup>5,6</sup> Se reconocen tres grupos de riesgo: bajo, intermedio y alto.<sup>7</sup> Esta clasificación es útil para elegir la mejor opción de consolidación luego que el paciente logre la remisión con el esquema de inducción, ya sea quimioterapia o un trasplante de células hematopoyéticas. Por ejemplo, un paciente con inversión del cromosoma 16 tiene riesgo bajo; un paciente con cariotipo normal tiene riesgo intermedio y un paciente con monosomía de los cromosomas 5 o 7 tiene riesgo alto. Esto permite con gran certeza conocer el futuro del paciente y sus posibilidades de supervivencia si solo se trata con quimioterapia convencional. La decisión de trasplantar a un paciente joven, con buena respuesta a la quimioterapia suele depender en gran parte de esta información. En los pacientes con citogenética normal resultan de gran utilidad los marcadores moleculares, como el FLT3-ITD, CEBPA y NPM1, marcadores de pronóstico para identificar el riesgo de recaída después de que se ha logrado la remisión completa.<sup>8</sup>

Otro ejemplo notable es el caso de la variante M3, leucemia que es identificada por la translocación balanceada entre los cromosomas 15 y 17, con su gen quimérico PML-RAR, la cual no debe considerarse candidata a trasplante a menos que el paciente tenga una recaída o resistencia al tratamiento moderno que puede incluir el ácido holo-transretinoico y el trióxido de arsénico.<sup>9-12</sup>

El tratamiento convencional de la leucemia mieloblástica aguda (con excepción de la leucemia promielocítica o M3) se basa en quimioterapia denominada 3+7, que incluye inicialmente tres dosis de antraciclina (daunomicina 45-90 mg por día por 3 días) y siete días de citarabina 100 a 200 mg/m<sup>2</sup>/día intravenosos en infusión continua por siete días.<sup>13,14</sup> Una vez obtenida la remisión se utilizan dosis altas de citarabina por 2-3 ciclos y termina el tratamiento.<sup>15</sup> Aun en el mejor de los casos, es decir pacientes jóvenes con riesgo bajo, la cifra de 40-50% de supervivencia es lo habitual.<sup>16</sup> En el tercer mundo las cifras son mucho menos alentadoras, en nuestro país difícilmente logramos cifras superiores al 20% a cinco años del diagnóstico.<sup>17</sup>

## TRASPLANTE VS QUIMIOTERAPIA

Una vez que el paciente se encuentra en su primera remisión, el tratamiento de consolidación debe ser elegido de acuerdo con el grupo de riesgo del paciente. Los pacientes de riesgo bajo o habitual [t(8;21), inv(16), t(16;16)] deben recibir terapia con dosis altas de citarabina.<sup>15</sup> Estos pacientes pueden tener una supervivencia de 60% cuando se utilizan 2 a 4 ciclos de consolidación con dosis altas de citarabina. Los pacientes de riesgo bajo no obtienen beneficio si reciben un trasplante autólogo o alogénico cuando están en su primera remisión por lo que no está indicado en estos pacientes. Los pacientes de riesgo intermedio y alto idealmente deben ser candidatos a un trasplante de células hematopoyéticas ya que cuando se utiliza solamente quimioterapia (dosis altas de Ara-C) como consolidación, la supervivencia es menor al 20%.<sup>18</sup> El trasplante autólogo de células hematopoyéticas (auto-TCH) es una opción que puede utilizarse principalmente en los pacientes que no disponen de un donador HLA compatible o en pacientes mayores de 70 años con co-morbilidades que limitan la realización de un trasplante alogénico. Vellenga y colaboradores demostraron en un estudio aleatorizado de pacientes con leucemia mieloblástica aguda en primera remisión, que los pacientes que recibieron un auto-TCH tienen menos recaídas que los que recibieron solamente quimioterapia (58% vs 70%, p=0.02).<sup>19</sup> De acuerdo con el CIBMTR (Center for International Blood and Marrow Transplant Research) la supervivencia de pacientes con leucemia mieloblástica aguda que reciben un auto-TCH en etapa inicial de la enfermedad es de 45% a cinco años. En el Cuadro 1 se señalan algunos de los estudios publicados.

## TRASPLANTE ALOGÉNICO

El trasplante alogénico de células hematopoyéticas Alo-TCH es la mejor alternativa en pacientes con leucemia mieloblástica aguda de riesgo intermedio y alto ya que puede curar aproximadamente al 50% de estos enfermos. El efecto curativo de esta opción terapéutica se debe a la acción de la quimioterapia utilizada en el esquema de acondicionamiento, en combinación con la enfermedad injerto contra leucemia.<sup>20</sup> De acuerdo con datos del CIBMTR actualmente la leucemia mieloblástica aguda es la principal indicación para alo-TCH, con lo que se consigue una supervivencia en pacientes que se trasplantan en etapa



inicial de la enfermedad de 55% a cinco años contra 20% de los que se trasplantan en etapas avanzadas. Puede ser controversial realizar un alo-TCH en pacientes con bajo riesgo de recaída, pero en los de alto riesgo en primera remisión, segunda remisión o pacientes con enfermedad resistente, el alo-TCH es la mejor opción terapéutica. Además, es conveniente tomar en cuenta que los pacientes que se trasplantan en segunda remisión o con actividad leucémica tendrán menos posibilidades de lograr remisión con el trasplante.<sup>21</sup> Una vez que se ha tomado la decisión de realizar un alo-TCH de donador relacionado es necesario elegir el esquema de acondicionamiento que se utilizara, tomando en cuenta las ventajas y desventajas que ofrecen los esquemas mieloablativos y los de intensidad reducida.

### TRASPLANTE MIELOABLATIVO

Este tipo de trasplante se basa, en buena parte, en quimioterapia intensiva o radioterapia con quimioterapia, está indicado en pacientes jóvenes menores de 50 años y en buen estado físico. Es ideal para pacientes con resistencia a la quimioterapia o en segunda remisión. La quimioterapia intensiva puede, en teoría, eliminar una gran parte de la clona maligna y permitir que se establezca el efecto del injerto contra el tumor. Es un trasplante con gran riesgo que requiere obligatoriamente hospitalización y su costo es mayor al trasplante de intensidad reducida.

Si el trasplante se efectúa cuando aún se encuentran blastos en la médula ósea (más del 5%) o circulando, las posibilidades de remisión prolongada o curación se reducen notablemente. En un análisis del CIBMTR realizado en 1673 pacientes sin remisión al momento del trasplante, se documentó una supervivencia a cinco años del 17%.<sup>8</sup> Esta cifra no es del todo mala si consideramos que la quimioterapia u otra modalidad no prolongan significativamente la supervivencia, dicho de otra manera, una modalidad otorga 17% y la otra 0%. Es evidente que el alo-TCH mieloablativo ha aumentado la supervivencia de pacientes con leucemia mieloblástica aguda, pero su utilidad está reservada prácticamente para ciertos grupos de pacientes jóvenes.<sup>22</sup> La mayoría de los pacientes con leucemia mieloblástica aguda no pueden beneficiarse con esta opción terapéutica ya que la edad promedio al momento del diagnóstico es de 67 años.<sup>22</sup> Las principales limitaciones de los esquemas mieloablativos son el costo,

la edad del paciente y la mortalidad relacionada con la toxicidad del esquema de acondicionamiento.

En un país con recursos limitados, la decisión de trasplantar a estos pacientes debe ser meditada cuidadosamente. Se debe insistir siempre en efectuar el trasplante en el momento de la remisión completa.

### TRASPLANTE DE INTENSIDAD REDUCIDA

Las ventajas de este tipo de trasplante son múltiples: menos toxicidad, se puede efectuar en forma ambulatoria, no se requiere una unidad de trasplante de médula ósea convencional, se puede llevar a cabo en pacientes hasta de 70 años y es de menor costo. En un estudio mexicano multicéntrico se demostró que alrededor de 60% de los pacientes con leucemia mieloblástica aguda obtienen buenos resultados a mediano plazo.<sup>23</sup>

De la misma forma que ocurre en el trasplante mieloablativo, los pacientes que se trasplantan en segunda remisión con esquemas de intensidad reducida tienen peor pronóstico. En un estudio realizado en México comparando el alo-TCH en pacientes con leucemia mieloblástica aguda en primera remisión vs segunda remisión se encontró que la frecuencia de recaída fue menos frecuente en el grupo trasplantado en primera remisión (35 vs 95%,  $p < 0.05$ ) con supervivencia de 50% y 15%, respectivamente.<sup>21</sup> (Cuadro 2)

Un estudio muy interesante, aunque retrospectivo, hace una comparación entre los pacientes con leucemia mieloblástica aguda de alto riesgo en primera remisión, los pacientes que tuvieron donador compatible trasplantados con un esquema de intensidad reducida y el resto recibió quimioterapia. El grupo de trasplante de intensidad reducida presentó supervivencia libre de enfermedad de 54% y el grupo de quimioterapia sólo 30% ( $p < 0.01$ ).<sup>24</sup> Esta es también nuestra experiencia y siempre que existe un donador disponible y compatible, preferimos el trasplante a la quimioterapia, a menos que se trate de un paciente con muy buen pronóstico.

El trasplante de intensidad reducida es comparable al convencional mieloablativo, si bien los pacientes recaen con mayor frecuencia con el trasplante de intensidad reducida, la mortalidad relacionada con el trasplante es menor y por ello las posibilidades de supervivencia son muy similares a largo plazo. En un estudio realizado recientemente se comparó la supervivencia de pacientes

**Cuadro 1.** Supervivencia de pacientes con leucemia mieloblástica aguda y trasplante autólogo

<i>Estudio</i>	<i>Edad (límites)</i>	<i>Acondicionamiento</i>	<i>n</i>	<i>Recaída</i>	<i>MRT</i>	<i>Supervivencia</i>
Vellenga, et al <sup>19</sup> HOVON	49 (16-60)	Bu-Cy	258	58%	4%	44% en RC1
Thomas, et al <sup>30</sup> GIMEMA	63 (60-69)	BAVC	35	57%	15%	39% en RC1
de Witte, et al <sup>31</sup>	51 (16-67)	Cy-TBI or BuCy	65	60%	12%	37% en RC1
Martins, et al <sup>32</sup>	24 (2-56)	Bu-Mel Bu-V	42	48%	14%	52% en RC1

MRT=mortalidad relacionada con el trasplante, RC1= trasplante en primera remisión completa, RC2= trasplante en segunda remisión completa, Flu=fludarabina, Cy=ciclofosfamida, Bu=busulfán, Mel=melfalán, C=citarabina, Id=idarrubicina, ATG=globulina antitímocito, B=carmustine, A=amsacrina, V=etopósido, TBI=total body irradiation.

**Cuadro 2.** Supervivencia de pacientes con leucemia mieloblástica aguda y trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida

<i>Estudio</i>	<i>Edad</i>	<i>Acondicionamiento</i>	<i>n</i>	<i>Recaída</i>	<i>MRT</i>	<i>Supervivencia</i>
Gutiérrez, et al <sup>21</sup>	31 (3-49)	Flu-Cy-Bu	31	54%	10%	50% en RC1 15% RC2
De Lima, et al <sup>26</sup>	58 (22-75)	Flu-Mel Flu-AraC-Id	11	40%	30%	40% en RC1
Blaise et al <sup>27</sup>	52 (26-60)	Flu-Bu-ATG	31	18%	9%	79% en RC1
Van Besien et al <sup>28</sup>	52 (17-71)	Flu-Mel-C	9	32%	11%	48% en RC1
Grigg et al <sup>29</sup>	45 (19-60)	Flu-Cy	34	37%	15%	68% en RC1

MRT=mortalidad relacionada con el trasplante, RC1=trasplante en primera remisión completa, RC2= trasplante en segunda remisión completa, Flu=fludarabina, Cy=ciclofosfamida, Bu=busulfán, Mel=melfalán, AraC=citarabina, Id=idarrubicina, ATG=globulina antitímocito, C=alemtuzumab.

con leucemia mieloblástica aguda que recibieron un alo-TCH con esquema de acondicionamiento mieloablatoivo vs un trasplante de intensidad reducida,<sup>22</sup> se incluyeron 45 y 67 pacientes respectivamente, y no se encontró diferencia significativa a dos años, pero sí se observó mayor mortalidad por causa diferentes a la recaída leucémica en el grupo de trasplante mieloablatoivo (22 vs 8%). Es importante señalar que en muchos de los estudios comparativos entre trasplante con esquema mieloablatoivo o no mieloablatoivo, los pacientes que ingresan al grupo de trasplante de intensidad reducida son los que tienen mayor edad o peor estado general, por lo que no son candidatos a recibir un trasplante mieloablatoivo. Quizá si se incluyeran pacientes jóvenes rutinariamente para

recibir un trasplante con acondicionamiento de intensidad reducida, los resultados serían aún mejores.<sup>23</sup>

## DONADOR NO RELACIONADO

Sólo 25% de los pacientes que requieren un trasplante alogénico tiene un donador HLA compatible. El uso de donadores HLA idénticos diferentes a los hermanos y de células del cordón umbilical permite que en los países desarrollados, virtualmente todos los pacientes con indicación puedan potencialmente ser trasplantados. Los resultados no son iguales, pero sí son mejores que la quimioterapia en pacientes de alto riesgo. Las unidades de células de cordón umbilical pueden utilizarse con algunos

antígenos HLA incompatibles entre unidad y receptor aumentando la posibilidad de encontrar una unidad compatible; sin embargo, muchas de las unidades de células de cordón no tienen el número suficiente de células hematopoyéticas, por lo que no pueden utilizarse en primera instancia. El trasplante haploidéntico promete ser una opción que podría llegar a sustituir a otras alternativas. Inicialmente el trasplante haploidéntico se utilizó en forma aislada debido a la alta incidencia de enfermedad injerto contra huésped en trasplantes no manipulados; sin embargo, actualmente con la posibilidad de realizar una selección de células hematopoyéticas CD34+ para ser trasplantadas, este tipo de trasplante se ha incrementado cuando no hay un donador HLA compatible. Existen otros métodos para evitar el rechazo y la enfermedad de injerto contra huésped, entre ellos alemtuzumab *in vivo* o *in vitro* y las dosis altas de ciclofosfamida postrasplante.<sup>33</sup> El trasplante haploidéntico se encuentra en una etapa de muy rápido desarrollo y es ya una opción interesante en nuestro medio. En un estudio publicado Aversa y colaboradores demostraron una supervivencia de 48% a 22 meses en 42 pacientes que recibieron un trasplante haploidéntico por leucemia mieloblástica aguda en primera o segunda remisión y con incidencia de enfermedad injerto contra huésped aguda de 8%.<sup>25</sup> El costo de este tipo de trasplante continúa siendo elevado para países en desarrollo lo que limita su aplicación rutinaria; sin embargo, es posible adaptarlo a las circunstancias mexicanas y de países en desarrollo.

## CONCLUSIONES

Es necesario definir el grupo de riesgo al que pertenece cada paciente con leucemia mieloblástica aguda de acuerdo no sólo con la edad del paciente o variedad histológica de la leucemia, sino también empleando estudios de citogenética y marcadores moleculares con el fin de ofrecerle la mejor opción terapéutica. Es indudable que el trasplante de células hematopoyéticas continúa siendo un recurso curativo para los pacientes con leucemia mieloblástica aguda de riesgo intermedio o alto y pacientes de riesgo bajo en recaída. Los pacientes de riesgo alto e intermedio son candidatos a trasplante lo más pronto posible luego de la primera remisión. La elección del tipo de trasplante siempre deberá individualizarse tomando en cuenta las condiciones clínicas del paciente, su riesgo,

la disponibilidad de un donador compatible y las posibilidades económicas.

## REFERENCIAS

1. Pulte D, Gondos A, Brenner H. Improvements in survival of adults diagnosed with acute myeloblastic leukemia in the early 21st century. *Haematologica* 2008;93(4):594-600.
2. Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2006;368(9550):1894-907.
3. Drexler HG. Classification of acute myeloid leukemias—a comparison of FAB and immunophenotyping. *Leukemia* 1987;1(10):697-705.
4. Sekeres MA, Peterson B, Dodge RK, Mayer RJ, Moore JO, Lee EJ, et al. Differences in prognostic factors and outcomes in African Americans and whites with acute myeloid leukemia. *Blood* 2004;103(11):4036-42.
5. Olesen LH, Aggerholm A, Andersen BL, Nyvold CG, Guldberg P, Norgaard JM, et al. Molecular typing of adult acute myeloid leukaemia: significance of translocations, tandem duplications, methylation, and selective gene expression profiling. *Br J Haematol* 2005;131(4):457-67.
6. Estey EH. Therapeutic options for acute myelogenous leukemia. *Cancer*. 2001;92(5):1059-73.
7. Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*. 2001;98(5):1312-1320.
8. Gupta V, Tallman MS, Weisdorf DJ. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia: myths, controversies, and unknowns. *Blood* 2011;117(8):2307-2318.
9. Niu C, Yan H, Yu T, Sun HP, Liu JX, Li XS, et al. Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients. *Blood* 1999;94(10):3315-3324.
10. Mathews V, George B, Lakshmi KM, Viswabandya A, Bajel A, Balasubramanian P, et al. Single-agent arsenic trioxide in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: durable remissions with minimal toxicity. *Blood* 2006;107(7):2627-2632.
11. Estey E, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Faderl S, Verstovsek S, Jones D, et al. Use of all-trans retinoic acid plus arsenic trioxide as an alternative to chemotherapy in untreated acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2006;107(9):3469-3473.
12. Hu J, Liu YF, Wu CF, Xu F, Shen ZX, Zhu YM, et al. Long-term efficacy and safety of all-trans retinoic acid/arsenic trioxide-based therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(9):3342-3347.
13. Arlin Z, Case DC, Jr, Moore J, Wiernik P, Feldman E, Saletan S, et al. Randomized multicenter trial of cytosine arabinoside with mitoxantrone or daunorubicin in previously untreated adult patients with acute nonlymphocytic leukemia (ANLL). *Lederle Cooperative Group. Leukemia* 1990;4(3):177-183.

14. MacCallum PK, Davis CL, Rohatiner AZ, Lim J, Gupta RK, Whelan JS, et al. Mitoxantrone and cytosine arabinoside as treatment for acute myelogenous leukemia (AML) at first recurrence. *Leukemia* 1993;7(10):1496-1499.
15. Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, Carroll A, Pettenati MJ, Tantravahi R, et al. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res* 1998;58(18):4173-4179.
16. Ohtake S, Miyawaki S, Fujita H, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, et al. Randomized study of induction therapy comparing standard-dose idarubicin with high-dose daunorubicin in adult patients with previously untreated acute myeloid leukemia: the JALSG AML201 Study. *Blood* 2011;117(8):2358-2365.
17. Lobato-Mendizabal E, Ruiz-Arguelles GJ, Gomez-Almaguer D, Ganci-Cerrud G, Lozano de la Vega A, Labardini-Mendez J. [Long-term treatment and prognostic factors in adult acute myeloblastic leukemia. Experience of the INNSZ group Puebla-Monterrey-Mexico]. *Rev Invest Clin* 1991;43(3):215-222.
18. Yanada M, Matsuo K, Emi N, Naoe T. Efficacy of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on cytogenetic risk for acute myeloid leukemia in first disease remission: a metaanalysis. *Cancer* 2005;103(8):1652-1658.
19. Vellenga E, van Putten W, Ossenkoppele GJ, Verdonck LF, Theobald M, Cornelissen JJ, et al. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Blood* 2011;118(23):6037-6042.
20. Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* 2008;112(12):4371-4383.
21. Gutierrez-Aguirre CH, Cantu-Rodriguez OG, Gonzalez-Llano O, Salazar-Riojas R, Martinez-Gonzalez O, Jaime-Perez JC, et al. Non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation is of limited value in advanced or refractory acute myeloblastic leukemia. The Mexican experience. *Hematology* 2007;12(3):193-197.
22. Shimoni A, Hardan I, Shem-Tov N, Yeshurun M, Yerushalmi R, Avigdor A, et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in AML and MDS using myeloablative versus reduced-intensity conditioning: the role of dose intensity. *Leukemia* 2006;20(2):322-328.
23. Ruiz-Arguelles GJ, Gomez-Almaguer D, David-Gomez-Rangel J, Vela-Ojeda J, Cantu-Rodriguez OG, Jaime-Perez JC, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with non-myeloablative conditioning in patients with acute myelogenous leukemia eligible for conventional allografting: a prospective study. *Leuk Lymphoma* 2004;45(6):1191-1195.
24. Mohty M, de Lavallade H, Ladaïque P, Faucher C, Vey N, Coso D, et al. The role of reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia: a donor vs no donor comparison. *Leukemia* 2005;19(6):916-920.
25. Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, Falzetti F, Carotti A, Ballanti S, et al. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol.* 2005;23(15):3447-3454.
26. de Lima M, Anagnostopoulos A, Munsell M, Shahjahan M, Ueno N, Ippoliti C, et al. Nonablative versus reduced-intensity conditioning regimens in the treatment of acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome: dose is relevant for long-term disease control after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2004;104(3):865-872.
27. Blaise DP, Michel Boiron J, Faucher C, Mohty M, Bay JO, Bardoux VJ, et al. Reduced intensity conditioning prior to allogeneic stem cell transplantation for patients with acute myeloblastic leukemia as a first-line treatment. *Cancer* 2005;104(9):1931-1938.
28. van Besien K, Artz A, Smith S, Cao D, Rich S, Godley L, et al. Fludarabine, melphalan, and alemtuzumab conditioning in adults with standard-risk advanced acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol* 2005;23(24):5728-5738.
29. Grigg AP, Gibson J, Bardy PG, Reynolds J, Shuttleworth P, Koelmeier RL, et al. A prospective multicenter trial of peripheral blood stem cell sibling allografts for acute myeloid leukemia in first complete remission using fludarabine-cyclophosphamide reduced intensity conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13(5):560-567.
30. Thomas X, Suci S, Rio B, Leone G, Brocchia G, Fillet G, et al. Autologous stem cell transplantation after complete remission and first consolidation in acute myeloid leukemia patients aged 61-70 years: results of the prospective EORTC-GIMEMAAML-13 study. *Haematologica* 2007;92(3):389-396.
31. de Witte T, Hagemeijer A, Suci S, Belhabri A, Delforge M, Kobbe G, et al. Value of allogeneic versus autologous stem cell transplantation and chemotherapy in patients with myelodysplastic syndromes and secondary acute myeloid leukemia. Final results of a prospective randomized European Intergroup Trial. *Haematologica* 2010;95(10):1754-1761.
32. Martins C, Lacerda JF, Lourenco F, Carmo JA, Lacerda JM. Autologous stem cell transplantation in acute myeloid leukemia. Factors influencing outcome. A 13 year single institution experience. *Acta Med Port* 2005;18(5):329-337.
33. Reisner Y, Hagin D, Martelli M. Haploidentical hematopoietic transplantation: current status and future perspectives. *Blood* 2011;118 (23):6006-6017.

## Trasplante de médula ósea exitoso en una paciente testigo de Jehová

María José Benzo-Hernández, Nancy Alam, Sócrates Sosa, Gladys Paulino

### RESUMEN

La aplicación de altas dosis de quimioterapia seguida de trasplante autólogo de células madre, se ha convertido en un recurso terapéutico imprescindible en la práctica de la medicina moderna. Es el tratamiento estándar del mieloma múltiple y de linfomas en recaída o de alto riesgo. Para evitar las complicaciones hemorrágicas y tratar la anemia, los pacientes que reciben este tipo de procedimiento requieren ser transfundidos con paquetes globulares y plaquetas. Los Testigos de Jehová se niegan a la transfusión de sangre y de hemoderivados por convicciones religiosas, lo que hace que el tratamiento de pacientes con hemopatías malignas sea un verdadero reto. Este artículo describe el protocolo utilizado en un trasplante autólogo de médula ósea en una paciente con enfermedad de Hodgkin en recaída, testigo de Jehová.

**Palabras clave:** trasplante de médula ósea, testigo de Jehová.

### ABSTRACT

High-dose chemotherapy followed by hematopoietic stem cell transplantation is currently an essential therapeutic resource in the practice of modern medicine; it is the standard treatment of patients with multiple myeloma and high-risk or relapsed lymphomas. In order to avoid hemorrhagic complications and treat anemia, patients who undergo this kind of treatment, require transfusion of blood products with packed red blood cells and / or platelets. Jehovah's witnesses refuse blood and blood derivatives transfusions because of religious beliefs turning the treatment of hematologic patients in a real challenge. This paper describes the protocol used in an autologous bone marrow transplant in a Jehovah witness patient with a relapsed Hodgkin's disease.

**Key words:** Bone marrow transplant, Jehova's Witness

Las dosis altas de quimioterapia seguidas de trasplante de células hematopoyéticas autólogas, se han convertido en el tratamiento de elección de muchas enfermedades hematológicas y oncológicas. Se ha comprobado que prolonga la vida en pacientes con mieloma múltiple<sup>1,2</sup> y provee la mejor opción de supervivencia libre de enfermedad para pacientes con linfomas cuando lo comparamos con la quimioterapia estándar.<sup>3,4</sup> Las complicaciones relacionadas con el procedimiento incluyen infecciones, anemias y hemorragias, por lo que se requiere un soporte transfusional

adecuado. En nuestra casuística de trasplante de médula ósea hemos utilizado, en promedio, cuatro unidades de paquetes globulares y cinco unidades de plaquetas por aféresis por paciente.

Este artículo describe la experiencia de una paciente con enfermedad de Hodgkin en recaída, que se sometió a un trasplante de médula ósea autólogo, aún siendo Testigo de Jehová.

### Caso clínico

Paciente femenina de 20 años de edad, con historia de alteración del estado general, fiebre y pérdida de peso. En marzo de 2010 se comprobó una masa inguinal izquierda, que en la biopsia se consideró linfoma de Hodgkin clásico (CD 15+, CD 20+ y CD 30+). Las tomografías mostraron adenopatías cervicales y mediastinales; además, la biopsia de médula ósea mostró infiltración por el tumor. Se trató de un linfoma de Hodgkin estadio clínico IVB.

Recibió seis ciclos de quimioterapia con base en el esquema de ABVD, fuera de nuestra Institución. En

Unidad de Onco-hematología, Hospital General de la Plaza de la Salud. Santo, Domingo, República Dominicana.

Este artículo debe citarse como: Benzo-Hernandez MJ, Alam N, Sosa S, Paulino G. Trasplante de médula ósea exitoso en una paciente testigo de Jehová. Rev Hematol Mex 2012;13(2):80-82.

[www.nietoeditores.com.mx](http://www.nietoeditores.com.mx)



diciembre de 2010, por recaída de su enfermedad, fue referida a nuestro centro. A su llegada se comprobó que tenía alteración del estado general, fatiga, sudores nocturnos y fiebre vespertina. Las pruebas de laboratorio mostraron: Hb 10g/dL, eritrosedimentación en 55 mm/h. Las tomografías reportaron derrame pleural, adenopatías parahiliares (4 cm la de mayor diámetro), esplenomegalia y múltiples adenopatías en todo el retroperitoneo (2.8 cm, la de menor diámetro y 5.2 cm, la mayor); en la pelvis se observó una masa inguinal izquierda de 7.6 x 6.5 cm. La biopsia de médula ósea se reportó normal. Se planificó tratamiento con quimioterapia con el esquema de BEACOP (bleomicina 10 mg/m<sup>2</sup> día 8, etopósido 200 mg/m<sup>2</sup> día 1-3, doxorubicina 35 mg/m<sup>2</sup> día 1, ciclofosfamida 1250 mg/m<sup>2</sup> día 1, vincristina 1.4 mg/m<sup>2</sup> max 2 mg día 8, procarbazona 100 mg/m<sup>2</sup> día 1-7, prednisona 40 mg/m<sup>2</sup> día 1-14) seguido de trasplante autólogo de médula ósea. Se aplicaron tres ciclos de tratamiento entre enero, y marzo de 2011. El tratamiento fue bien tolerado desde el punto de vista clínico y hematológico y la respuesta fue buena. Los controles tomográficos reportaron la desaparición del derrame pleural y de las adenopatías mediastinales, sólo se mantuvo: esplenomegalia, una adenopatía retroperitoneal de 4 cm de diámetro y una masa inguinal izquierda. Esa masa era una cápsula quística con agregados linfocitarios, sin evidencia de malignidad. Al término del tercer ciclo se conversa con la paciente y familiares acerca del trasplante y aceptaron los riesgos que implica el procedimiento sin el uso de hemoderivados posterior a la infusión de la médula ósea. En julio de 2011 se ingresó la paciente para recibir trasplante autólogo de médula ósea. El día -4 la paciente fue llevada al quirófano, donde bajo anestesia general se le realizaron múltiples aspiraciones de médula ósea de los huesos ilíacos hasta obtener 10 mL por kg de peso corporal. Se colectaron 1.7 por 10<sup>6</sup> células CD34(+). Del día -3 al día -1 la paciente recibió quimioterapia a altas dosis. El régimen de acondicionamiento utilizado fue el ICE (carboplatino 1.5 g/m<sup>2</sup>, etopósido 2.1 g/m<sup>2</sup>, ifosfamida 10 g/m<sup>2</sup>). El día 0 se reinfundió la médula ósea por catéter venoso central. Antes de ser ingresada, la paciente recibió tratamiento hormonal para el cese de la menstruación y durante su ingreso se utilizó protección gástrica y profilaxis antibacteriana y antimicótica. Comenzó tratamiento con hierro IV, vitamina C y eritropoyetina desde que finalizó la quimioterapia de acondicionamiento. El día +1 del

trasplante se comenzó el uso de GSF-GM; y el día +5, de factor estimulante de plaquetas.

La paciente hizo una aplasia medular severa; las concentraciones más bajas fueron: GB 0.34k/ul, el día +5, Hb 8g/dL el día+ 6 y plaquetas 8,000k/ul el día +9. Como complicaciones tuvo fiebre asociada con un hemocultivo positivo a *Staphylococcus aureus* que fue tratada con ceftriaxona y amikacina, con lo que se yuguló el proceso infeccioso. Además, presentó hematuria asociada con la trombocitopenia y mucositis grado 1. La paciente permaneció en aislamiento invertido en el área destinada para trasplante de médula ósea desde el día -1 hasta el día +17, cuando se trasladó a una habitación común. Se dio de alta el día +19 postrasplante en excelente estado general con el siguiente hemograma: GB 2,700/ul, Hb 8.7 g/dL, plaquetas 49,000/ul. En febrero de 2012 la paciente tuvo un Karnofsky de 100%, en remisión clínica, biológica y radiográfica y sus tomografías están normales.

## DISCUSIÓN

La mayoría de los centros no realiza trasplantes de médula ósea a pacientes Testigo de Jehová, que se niegan a la transfusión, por los riesgos vitales que implica, especialmente en el sangrado gastrointestinal, intracranial y pulmonar que pueden afectar la vida del paciente. En el mundo actual hay alrededor de 6.5 millones de personas con esta creencia religiosa, más de un millón se encuentran en Estados Unidos; en nuestro país hay 35,000 personas, los primeros se establecieron a partir de 1870.<sup>5,6,7</sup> Este informe describe la experiencia de una paciente con enfermedad de Hodgkin en recaída, que recibió trasplante de médula ósea autólogo, siendo Testigo de Jehová. En México, Ruiz-Argüelles y colaboradores demostraron que es posible llevar a cabo trasplantes de células hematopoyéticas autólogas y alogénicas sin transfusión de productos sanguíneos.<sup>8</sup> Los métodos modernos para realizar los trasplantes de células hematopoyéticas permiten trasplantar a pacientes que antaño no eran aptos para estos tratamiento, por sus condiciones generales o por sus creencias religiosas.<sup>9</sup>

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Andrea Ledesma la escritura del resumen en inglés.

## REFERENCIAS

1. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple mieloma. Intergroupe Francais du Myélome. *N Engl J Med* 1996;335:91-97.
2. Child JA, Morgan GJ, Davies FE, et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple mieloma. *N Engl J Med* 2003;348:1875-1883.
3. Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, et al. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1995;333:1540-1545.
5. Baron F, Frere P, Fillet G, Beguin Y. Recombinant human erythropoietin therapy is very effective after an autologous peripheral blood stem cell transplant when started soon after engraftment. *Clin Cancer Res* 2003;9:5566-5572.
7. The real value of blood. *Awake!* 2006, August:10-12
8. Ruiz-Argüelles GJ, Morales-Toquero A, López-Martínez B, Tarín-Arzaga LC, Manzano C.: Bloodless (transfusion-free) hematopoietic stem cell transplants: The Mexican experience. *Bone Marrow Transpl* 2005, 36:715-720.
9. Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles GJ, Lozano-de-la-Vega A, García-Guajardo BM. Leucemia aguda en testigos de Jehová: Dificultades en su manejo. *Rev Invest Clin Méx* 1990; 42:317-320.

**Revista de Hematología 2012;13 (supl 1)**

**Dice**

**A1081 (pag S65)**

HODGKIN LYMPHOMA (HL) IN PATIENTS WITH HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV). Labarta JD\*, Varela AI\*\*, Figueroa MF\*\*, Zarate T\*\*, Pavlovsky C\*\*\*, Giere I\*\*\*, Lombardi V\*\*\*, Verri V\*\*\*\*, Gonzalez J\*\*\*\*, Flores GM\*\*\*\*, Larripa IB<sup>5</sup>, Mercado-Guzman ZV<sup>5</sup>, Otero IS\*\*, Lluésma-Goñalons M\*\*, Ardaiz M del C\*\*, Moiraghi EB\*\*. \*Genoma, Buenos Aires, Argentina; \*\* División Hematología del Hospital JM Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina; \*\*\*Fundaleu, Buenos Aires, Argentina; \*\*\*\* División Hematología del Hospital CG Durand, Buenos Aires, Argentina; <sup>5</sup>Departamento de Genética de la Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.

**Debe decir**

**A1081**

HODGKIN LYMPHOMA (HL) IN PATIENTS WITH HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV). Ardaiz M del C, Davico S, Bistman A, Figueroa F, Rigada G, Zarate T. Hospital Ramos Mejía, División Hematología, Buenos Aires Argentina.

**Dice**

**A1094 (pag S66)**

REPORT OF A PLASMABLASTIC LYMPHOMA (PBL) IN HIV NEGATIVE PATIENT. Labarta JD\*, Varela AI\*\*, Figueroa MF\*\*, Zarate T\*\*, Pavlovsky C\*\*\*, Giere I\*\*\*, Lombardi V\*\*\*, Verri V\*\*\*\*, Gonzalez J\*\*\*\*, Flores GM\*\*\*\*, Larripa IB<sup>5</sup>, Mercado-Guzman ZV<sup>5</sup>, Otero IS\*\*, Lluésma-Goñalons M\*\*, Ardaiz M del C\*\*, Moiraghi EB\*\*. \*Genoma, Buenos Aires, Argentina; \*\* División Hematología del Hospital JM Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina; \*\*\*Fundaleu, Buenos Aires, Argentina; \*\*\*\* División Hematología del Hospital CG Durand, Buenos Aires, Argentina; <sup>5</sup>Departamento de Genética de la Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.

**Debe decir**

REPORT OF A PLASMABLASTIC LYMPHOMA (PBL) IN HIV NEGATIVE PATIENT. Ardaiz M del C, Davico S, Zarate T, Figueroa F, Armocida I. Hospital Ramos Mejía, División Hematología, Buenos Aires Argentina.

[www.nietoeditores.com.mx](http://www.nietoeditores.com.mx)

**Dice**

**A1145 (pag S94)**

SPLENOMEGALY CONSEQUENCE OF EXTRAMEDULLARY HEMATOPOIESIS IN A. Popov MV\*\*\*, Vladareanu AM\*\*\*\*, Kovacs E\*\*, Savopol T\*\*, Iordache M\*\*, Begu M\*\*\*\*, Bumbea H\*\*\*\*, Onisai M\*\*\*\*, Nicolescu A\*\*\*\*, Popa C\*. \*County Emergency Hospital Arges, Hematology Department; \*\*University of Medicine and Pharmacy Carol Davilla, Bucharest; \*\*\*University Emergency Hospital Bucharest.

**Debe decir**

**A1145**

SPLENOMEGALY CONSEQUENCE OF EXTRAMEDULLARY HEMATOPOIESIS IN A PATIENT WITH HEREDITARY SPHEROCYTOSIS AND CHRONIC UNCLASSIFIED MYELOPROLIFERATIVE SYNDROME. CASE PRESENTATION. Popov MV\*\*\*, Bumbea H\*\*\*\*, Colita A\*\*\*\*, Uscatescu V\*\*\*\*, Cisleanu D\*\*\*\*, Gaman M\*\*\*\*, Ilea A\*\*\*\*, Dobrea C\*\*\*\*, Popa C\*. \*County Emergency Hospital Arges, Hematology Department; \*\*University of Medicine and Pharmacy Carol Davilla, Bucharest; \*\*\*University Emergency Hospital Bucharest. \*\*\*\*Fundeni Clinical Institute; \*\*\*\*\*Rutus Biotec Codlea.

**Dice**

**A1146 (pag S69)**

MULTIPLE EXTRAMEDULLARY PLASMACYTOMA - THE CLINICAL PICTURE OF RELAPSE IN A PATIENT WITH IG A MULTIPLE MYELOMA. Popov VM\*\*\*, Vladareanu AM\*\*\*\*, Kovacs E\*\*, Savopol T\*\*, Iordache M\*\*, Begu M\*\*\*\*, Bumbea H\*\*\*\*, Onisai M\*\*\*\*, Nicolescu A\*\*\*\*, Popa C\*. \*County Emergency Hospital Arges, Hematology Department; \*\*University of Medicine and Pharmacy Carol Davilla, Bucharest; \*\*\*University Emergency Hospital Bucharest.

**Debe decir**

**A1146**

MULTIPLE EXTRAMEDULLARY PLASMACYTOMA - THE CLINICAL PICTURE OF RELAPSE IN A PATIENT WITH IG A MULTIPLE MYELOMA. Popov VM\*\*\*, Dobrea C\*\*, Popescu M\*, Popescu MG\*, Popa C\*, Petri V\*, Vlădoiu L\*, Mihailescu A\*, Săconu B\*, Jînga N\*. \*County Emergency Hospital Arges, Hematology Department; \*\*University of Medicine and Pharmacy Carol Davilla, Bucharest; \*\*\*Fundeni Clinical Institute

# Normas para autores

Los manuscritos deben elaborarse siguiendo las recomendaciones del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (N Engl J Med 1997;336:309-15) y se ajustan a las siguientes normas:

1. El texto deberá entregarse impreso, por cuádruplicado, en hojas tamaño carta (21 × 27 cm), a doble espacio, acompañado del disquete con la captura correspondiente e indicando en la etiqueta el título del artículo, el nombre del autor principal y el programa de cómputo con el número de versión. (Ejemplo: Estrógenos en el climaterio. Guillermo Martínez. Word 6.0).
2. Las secciones se ordenan de la siguiente manera: página del título, resumen estructurado, abstract, introducción, material y método, resultados, discusión, referencias, cuadros, pies de figuras.
3. La extensión máxima de los *originales* será de 15 hojas, de los *casos clínicos* 8 hojas y cuatro figuras o cuadros. Las *revisiones* no excederán de 15 hojas.  
En la primera página figurará el título completo del trabajo, sin superar los 85 caracteres, los nombres de los autores, servicios o departamentos e institución (es) a que pertenece (n) y la dirección del primer autor. Si todos los autores pertenecen a servicios diferentes pero a una misma institución el nombre de ésta se pondrá una sola vez y al final. La identificación de los autores deberá hacerse con uno hasta cuatro asteriscos (\*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\*, \*\*\*\*\*); si son más autores utilice números en superíndice.
4. Para fines de identificación cada hoja del manuscrito deberá llevar, en el ángulo superior izquierdo, la inicial del nombre y el apellido paterno del primer autor y en el ángulo derecho el número progresivo de hojas.
5. Todo material gráfico deberá enviarse en diapositivas, en color o blanco y negro, nítidas y bien definidas. En el marco de cada diapositiva se anotará, con tinta, la palabra clave que identifique el trabajo, el número de la ilustración, apellido del primer autor y con una flecha se indicará cuál es la parte superior de la figura. Si la diapositiva incluyera material previamente publicado, deberá acompañarse de la autorización escrita del titular de los derechos de autor.
6. Las gráficas, dibujos y otras ilustraciones deben dibujarse profesionalmente o elaborarse con un programa de cómputo y adjuntarlas al mismo disquete del texto señalando en la etiqueta el programa utilizado.
7. Los cuadros (y no tablas) deberán numerarse con caracteres arábigos. Cada uno deberá tener un título breve; al pie del mismo se incluirán las notas explicativas que aclaren las abreviaturas poco conocidas. No se usarán líneas horizontales o verticales internas. Todos los cuadros deberán citarse en el texto.
8. Tipo de artículos: la revista publica artículos originales en el área de investigación clínica o de laboratorio, editoriales, artículos de revisión, biotecnología, comunicación de casos y cartas al editor. Se reciben artículos en los idiomas español e inglés.
9. Resumen. La segunda hoja incluirá el resumen, de no más de 250 palabras y deberá estar estructurado en antecedentes, material y método, resultados y conclusiones. Con esta estructura se deberán enunciar claramente los propósitos, procedimientos básicos, metodología, principales hallazgos (datos concretos y su relevancia estadística), así como las conclusiones más relevantes. Al final del resumen proporcionará de 3 a 10 palabras o frases clave. Enseguida se incluirá un resumen (abstract) en inglés.
10. Abstract. Es una traducción correcta del resumen al inglés.
11. Texto. Deberá contener introducción, material y métodos, resultados y discusión, si se tratara de un artículo experimental o de observación. Otro tipo de artículos, como comunicación de casos, artículos de revisión y editoriales no utilizarán este formato.
  - a) Introducción. Expresé brevemente el propósito del artículo. Resume el fundamento lógico del estudio u observación. Mencione las referencias estrictamente pertinentes, sin hacer una revisión extensa del tema. No incluya datos ni conclusiones del trabajo que está dando a conocer.
  - b) Material y método. Describa claramente la forma de selección de los sujetos observados o que participaron en los experimentos (pacientes o animales de laboratorio, incluidos los testigos). Identifique los métodos, aparatos (nombre y dirección del fabricante entre paréntesis) y procedimientos con detalles suficientes para que otros investigadores puedan reproducir los resultados. Explique brevemente los métodos ya publicados pero que no son bien conocidos, describa los métodos nuevos o sustancialmente modificados, manifestando las razones por las cuales se usaron y evaluando sus limitaciones. Identifique exactamente todos los medicamentos y productos químicos utilizados, con nombres genéricos, dosis y vías de administración.
  - c) Resultados. Preséntelos siguiendo una secuencia lógica. No repita en el texto los datos de los cuadros o figuras; sólo destaque o resuma las observaciones importantes.
  - d) Discusión. Insista en los aspectos nuevos e importantes del estudio. No repita pormenores de los datos u otra información ya presentados en las secciones previas. Explique el significado de los resultados y sus limitaciones, incluidas sus consecuencias para la investigación futura. Establezca el nexo de las conclusiones con los objetivos del estudio y absténgase de hacer afirmaciones generales y extraer conclusiones que carezcan de respaldo. Proponga nueva hipótesis cuando haya justificación para ello.
  - e) Referencias. Numere las referencias consecutivamente siguiendo el orden de aparición en el texto (identifique las referencias en el texto colocando los números en superíndice y sin paréntesis). Cuando la redacción del texto requiera puntuación, la referencia será anotada después de los signos pertinentes. Para referir el nombre de la revista utilizará las abreviaturas que aparecen enlistadas en el número de enero de cada año del Index Medicus. No debe utilizarse el término "comunicación personal". Sí se permite, en cambio, la expresión "en prensa" cuando se trata de un texto ya aceptado por alguna revista, pero cuando la información provenga de textos enviados a una revista que no los haya aceptado aún, citarse como "observaciones no publicadas". Se mencionarán todos los autores cuando éstos sean seis o menos, cuando sean más se añadirán las palabras y *col.* (en caso de autores nacionales) o *et al.* (si son extranjeros). Si el artículo referido se encuentra en un suplemento, agregará *Suppl X* entre el volumen y la página inicial. La cita bibliográfica se ordenará de la siguiente forma en caso de revista:  
Torres BG, García RE, Robles DG y col. Complicaciones tardías de la diabetes mellitus de origen pancreático. Rev Gastroenterol Mex 1992;57:226-9.  
Si se trata de libros o monografías se referirá de la siguiente forma:  
Hernández RF. Manual de anatomía. 2ª ed. México: Méndez Cervantes, 1991;pp:120-9.  
Si se tratara del capítulo de un libro se indicarán el o los autores del capítulo, nombre del mismo, ciudad de la casa editorial, editor del libro, año y páginas.
12. Transmisión de los derechos de autor. Se incluirá con el manuscrito una carta firmada por todos los autores, conteniendo el siguiente párrafo: "El/los abajo firmante/s transfieren/n todos los derechos de autor a la revista, que será propietaria de todo el material remitido para publicación". Esta cesión tendrá validez sólo en el caso de que el trabajo sea publicado por la revista. No se podrá reproducir ningún material publicado en la revista sin autorización.

**Revista de Hematología** se reserva el derecho de realizar cambios o introducir modificaciones en el estudio en aras de una mejor comprensión del mismo, sin que ello derive en un cambio de su contenido. Los artículos y toda correspondencia relacionada con esta publicación pueden dirigirse al e-mail: [gruiz1@clinicaruiz.com](mailto:gruiz1@clinicaruiz.com)

# Author requirements

Manuscripts should be made following recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (N Engl J Med 1997;336:309-15) and adjusted to the following guidelines:

1. The document printed in letter size (21 × 27 cm) sheets must be delivered, using double-spacing, along with its with corresponding computer disk data and indicating the article's title on the label, leading author's name and computer program with version. (e.g., Estrogen and climaterium. Guillermo Martínez. Word 6.0).  
Sections are ordered in the following form: page title, structured abstract, summary, introduction, materials and methods, results, discussion, references, tables and captions.
3. The maximum extension of originals will be 15 pages, for clinical cases 8 pages, and four for figures or tables. Reviews will not exceed 15 pages.  
The first page will contain the full title of the article, not exceeding 85 characters, the names of the authors, services or departments and institution(s) they belong to and the leading author's address. If all the authors belong to different services of the same institution, their name will be mentioned only once at the end. Authors identification should be done with one to four asterisks (\*, \*\*, \*\*\*, \*\*\*\*); if there are more authors use superscript Arabic numbers.
4. For identification, each page of the article should have, on the upper left corner, the initial of the name and last name of the leading author, and on the upper right corner, the consecutive page number.
5. All graphic material should be sent in slides, black-and-white, sharp and clearly defined. In the slide frame write in ink the code word to identify the article, the figure number, last name of the leading author and with an arrow the top part of the figure will be marked. If the slide includes material formerly published, it should come with the written authorization of the copyright holder.
6. Graphs, drawings and other illustrations should be professionally drawn or made by computer and attached in the same disk the text writing is, on the label written the program used.
7. Tables (and non-charts) should be numbered with Arabic numbers. Each should have a brief title; the footnotes will include explanatory notes to clarify abbreviations poorly known. Do not use horizontal or vertical inner lines. All tables should be quoted in the text.
8. Type of articles: the journal publishes original articles in the area of clinical or laboratory research, editorials, review articles, biotechnology, case communications and letters to the editor. Articles are received in Spanish and English languages.
9. Summary. The second page will include a summary, no longer than 250 words and will be structured in background, materials and methods, results and conclusions. Following this structure, purposes, basic proceedings, methodology, main outcomes (hard data and statistical significance), and most relevant conclusions. At the end of the summary there will be 3 to 10 keywords or sentences. Following this, an abstract written in English will be provided.
10. Abstract. This is the right translation of the summary to English.
11. Text. Text should contain introduction, materials and methods, results and discussion, if this is an experimental or observational article. Other articles, like case communications, review articles and editorials will not use this format.
  - a) Introduction. Briefly express the purpose of the article. Summarize the logic grounds of the study or observation. Quote only strictly pertinent references, without making a extensive review of the topic. Do not include data or conclusions of the job you are making known.

- b) Materials and methods. Describe clearly in the selection the way you selected the observed subjects or those who participated in the experiments (patients or laboratory animals, including controls). Identify methods, devices (name and address of the manufacturer in parentheses) and detailed procedures for others to reproduce the results. Briefly explain formerly published methods which are not widely known, describe new or substantially modified methods, manifesting the reasons why you used them and assessing their limitations. Identify every single medication and chemical product used, with generic name, dose and route of administration.
  - c) Results. Present them following in a logical sequence. Do not repeat data from tables or figures within the text; just emphasize or summarize the pertinent observations.
  - d) Discussion. Emphasize new and important aspects of the study. Do not repeat details in the data or other information previously mentioned in other sections. Explain the meaning of the results and their limitations, including their consequences for future research. Establish the connection of the conclusions with the study objectives and refrain from making general statements and making conclusions without support. Suggest a new hypothesis when it is justified.
  - e) References. Number the references consecutively following the appearance order in the text (identify the references within the text with superscript numbers without parentheses). When the text needs punctuation, the reference will be annotated after the pertinent signs. To refer the name of a journal use abbreviations listed every year in the January number of the Index Medicus. The term "personal communication" should not be used. On the other hand, it is allowed to use the expression "in press" when it refers to an already accepted text by some journal, but when the information comes from texts sent to a journal which has not accepted it yet, it should be referred to as "non-published observations". All authors should be mentioned when there are six or less, when there are more, add the words and cols. (in the case of national authors) or et al. (if foreigners). If the cited article is located in a supplement, add suppl X between the volume and the initial page.  
In the case of a journal, bibliographic citations will be ordered in this way:  
Torres BG, García RE, Robles DG et al. Late complications of diabetes mellitus of pancreatic origin. Rev Gastroenterol Mex 1992; 57:226-9.  
In the case of books or monographs, reference will be:  
Hernández RF. Anatomy manual. 2nd edition. Mexico: Méndez Cervantes, 1991:120-9.  
In the case of a book chapter, indicate the author(s) in the chapter, the name of the chapter, city of the publishing house, the book's editor, year and pages.
12. Transfer-of-copyright. Along with the manuscript, deliver a letter signed by all the authors, with the following paragraph: "The undersigned author(s) transfer all copyrights to the journal, which will be the holder of all submitted material for publication". This transfer will be valid only in the case that the journal publishes the paper. No material can be reproduced without the journal's authorization.
  13. We recommend to include citations from Mexican or Latin American authors in the bibliographic references.

**Hematología** reserves the right to make changes or include modifications in the study in order of better understanding of such, without modifying its content. Articles and all mailing relating with this publication should be addressed to the following e-mail: [gruiz1@clinicaruiz.com](mailto:gruiz1@clinicaruiz.com)