

11218



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

Hospital de Especialidades del Centro Médico  
"La Raza"

Instituto Mexicano del Seguro Social

7  
3g

LEUCEMIA PROMIELOCITICA AGUDA:  
ANALISIS Y TERAPEUTICA DE LA GENERACION  
DE TROMBINA Y FIBRINOLISIS ANORMALES

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TESIS DE POSTGRADO**

QUE PARA OBTENER EL TITULO EN:  
LA ESPECIALIDAD DE HEMATOLOGIA  
P R E S E N T A :

RAFAEL EDUARDO PAREDES GARCIA

Asesor: Dr. José González Llaven



IMSS

México, D. F.

1992



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE GENERAL

	pág.
ABREVIATURAS .....	1
OBJETIVOS .....	11
PROLOGO .....	111
RESUMEN .....	1V
I. INTRODUCCION .....	1
a) Concepto .....	1
b) Características clínicas .....	1
c) Inmunofenotipia y Citoquímica .....	3
d) Biología Celular del Promielocito Maligno .....	5
e) Biología Molecular del Promielocito Maligno .....	9
f) Coagulopatía en las Leucemias Promielocíticas .....	11
g) Estrategias en el tratamiento de las LPA .....	20
h) Experiencia en el Hospital de Especialidades del Centro Médico La Raza .....	23
II. PACIENTES Y METODOS .....	26
a) Estudios relacionados al estado hemostático .....	27
b) Terapia Transfusional .....	29
c) Tratamiento de la coagulopatía .....	29
III. RESULTADOS .....	32
IV. DISCUSION .....	48
V. CONCLUSIONES .....	54
APENDICES	
1) Técnica de Clauss para medir Fibrinógeno	
2) Actividad de Antiplasmina	
3) Semicuantificación de Dímero D	
4) Actividad de Antitrombina	
5) ELISA para Fragmento 1+2 de Protrombina	
6) ELISA ATM (Complejos de Antitrombina)	
7) ELISA para PAI-1	
8) ELISA para PFL	
9) ELISA para PFFbn	
10) ELISA para PFFbg	
11) Actividad heparínica antiXa	

## BIBLIOGRAFIA

**ABREVIATURAS.**

LPA: Leucemia Promielocítica Aguda  
FAB: Grupo Franco-Americano-Británico  
CID: Coagulación Intravascular Diseminada  
MIC: Clasificación Inmunológica y Morfológica  
RAR: Receptor de Acido Retinoico  
PFFbg: Productos de Fragmentación del Fibrinógeno  
PFFbn: Productos de Fragmentación de la Fibrina  
PFI: Productos de Fragmentación totales (Fibrina/fibrinógeno)  
ATIII: Antitrombina III  
TAT: Complejos Trombina:Antitrombina  
F1+2: Fragmento 1+2 de la Protrombina  
D-D: Dímero D  
tPA: Activador Tisular del Plasminógeno  
uPA: Activador tipo uroquinasa del plasminógeno  
PAI-1,2 y 3: Inhibidor del Activador de Plasminogeno, tipo 1,  
2 y 3  
AP: Alfa-2-antiplasmina  
PAP: Complejos Plasmina:Antiplasmina  
ATM: ELISA para determinar complejos de Antitrombina  
EACA: Acido epsilon-aminocaproico  
TP: Tiempo de Protrombina  
TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial activada  
TT: Tiempo de Trombina  
IL-1: Interleucina 1  
D.E.: Desviación estándar  
n.s.: no significativo

**O B J E T I V O S.**

1) Caracterizar por medio de ensayos de laboratorio idóneos la(s) alteración(es) de coagulación predominante en las Leucemias Promielocíticas.

2) Seleccionar los ensayos de laboratorio más útiles para el análisis clínico de la coagulopatía.

3) Determinar las ventajas del uso de anticoagulantes y antifibrinolíticos en el tratamiento de la coagulopatía.

## PROLOGO.

Este trabajo forma parte de un proyecto de Investigación encaminado al estudio de la Biología y Fisiopatología de la Leucemia Promielocítica, iniciado en 1990 en el Departamento de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico La Raza.

Se presentan los primeros resultados obtenidos con un enfoque de análisis y tratamiento novedosos.

Está fundamentado en un marco Biológico básico y clínico aplicados a la experiencia de nuestro Departamento.

Gran parte de los reactivos de laboratorio fueron gentilmente donados por el Dr. Alexander Duncan (Grady Memorial Hospital, Atlanta, USA), a quien también agradecemos sus comentarios y sugerencias.

Ojalá que este esfuerzo despierte interés y entusiasmo para que, a pesar de limitaciones técnicas, sea continuado en el futuro. Sólo se necesita el Espíritu y la Idea.

R.E.P.G.

Bahia de Kino, Sonora, 1992.

**RESUMEN**

Las Leucecias Promielociticas presentan caracteristicamente Generación de Trombina y Fibrinólisis anormales relacionadas con la población tumoral.

En todos nuestros pacientes encontramos valores significativamente elevados ( $P < 0.05$ ) de ensayos como el F1+2, ATM y de cuantitativos de productos líticos de fibrina y fibrinógeno.

Estas alteraciones se presentan simultáneamente y con diferencias de grado cuantitativo mientras no se logre la remisión de la Leuceemia.

Las pruebas de laboratorio clinicamente más útiles son la determinación de Dímero D, antiplasmina y niveles de Fibrinógeno.

El tratamiento oportuno con anticoagulantes (cumarínicos y/o Heparina) puede acortar el tiempo de evolución de la coagulopatía (8 días vs  $11.6 \pm 3.7$  d,  $P < 0.05$ ) y probablemente disminuya los requerimientos transfusionales. Es indispensable utilizar antifibrinolíticos y fibrinógeno de acuerdo a los resultados de las pruebas mencionadas.

**LEUCEMIA PROMIELOCITICA AGUDA:**

**ANALISIS Y TERAPEUTICA  
DE LA GENERACION DE TROMBINA  
Y FIBRINOLISIS ANORMALES**



## 1. INTRODUCCION

### A) Concepto.

La Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) es una variante de la clasificación FAB [1] con rasgos distintivos propios, a saber, una fisiopatogenia determinada por una alteración citogenética y molecular que detiene la maduración mielóide en una etapa intermedia (promielocito) y que presenta una coagulopatía severa relacionada con las sustancias producidas por la población tumoral.

En 1935 Risk ya había descrito unos padecimientos de características similares a las manifestadas por este tipo de leucemias; sin embargo, la denominación y comunicación de las mismas como las conocemos en la actualidad no se hizo hasta 1957, cuando Hillestad, además de identificar hipofibrinogenemias como causa de las graves hemorragias en estos pacientes leucémicos, demostró que sus médulas óseas tenían proliferación de promielocitos [2].

### B) Características clínicas.

Se considera que es un padecimiento que predomina en hombres adultos jóvenes [3], representando del 5 al 15% de los casos de Leucemias mieloblásticas [4]; aunque se ha mencionado hasta un 27% si se identifica correctamente la variedad hipogranular [5].

Además de las alteraciones cualitativas y cuantitativas de las series celulares mieloides y de los efectos del hipermetabolismo tumoral, expresado todo ello en diversos síndromes clínicos, las LPA tienen por característica principal una coagulopatía, presente clínicamente en alrededor del 80 a 90% de los casos [6]. Esta alteración se caracteriza por los elevados niveles de productos líticos de fibrina y fibrinógeno, así como hipofibrinogenemias, lo cual acompañado por los alargamientos de tiempos de coagulación y la trombocitopenia, originó que se la catalogara inicialmente como una Coagulación Intravascular Diseminada (CID) [7].

Aún cuando clínicamente no se detecte, en los estudios necrópsicos se ha identificado trombosis diseminada de pequeños y grandes vasos en el 15 a 25% de los casos [8].

La fisiopatología y tratamiento de estas complicaciones hemostáticas es controvertida y nos extenderemos sobre el particular, ya que en este tipo de Leucemias, se ha llegado a considerar que el pronóstico depende en su mayor parte del control de la coagulopatía.

La gravedad de la coagulopatía depende de los productos secretados por los promielocitos, por eso llega a su punto crítico durante el período de máxima lisis celular y desaparece en la hipoplasia medular lograda por la quimioterapia. Inclusive se habla de remisiones completas aún cuando no se abata totalmente la población neoplásica medular, teniendo esto interés porque surge la inquietud de si los promielocitos residuales logran diferenciarse totalmente en

algún momento ulterior [9].

En comparación con otras leucemias mieloblásticas, el pronóstico de esta variedad M3 es relativamente bueno si, como mencionamos antes, se controla oportunamente la coagulopatía, tal como lo demostró originalmente Cunningham después de una década de experiencia [10].

El grupo de Kantarjian intentó establecer criterios de mal pronóstico basados en una anemia menor de 10 g de hemoglobina/dl, menos de 50 000 plaquetas/microlitro, más de 1000 promielocitos/microlitro de sangre y más de 50 años de edad; pero todo era con el interés de determinar el grupo de pacientes que debería recibir heparina en forma profiláctica [11]. Si los pacientes acumulaban al menos dos de estos criterios, tenían una tasa de 58% de muertes por hemorragia, dicho porcentaje disminuía significativamente si se utilizaba heparina. Por lo controvertido de la fisiopatología de esta enfermedad, los criterios de Kantarjian no han tenido mucha aceptación.

#### C) Inmunofenotípa y citoquímica.

La citomorfología con tinción Wright distingue a la LPA en dos variantes, micro o hipogranular (27%) o hipergranular (73%); la primera suele presentarse con leucocitosis, sus células presentan núcleos lobulados y sus gránulos se tiñen con mieloperoxidasa en un porcentaje comparativamente más bajo [12, 13].

La variedad hipergranular es la clásica de los promielocitos anaplásicos que son fácilmente distinguidos por su granulación gruesa azurófila y los múltiples cuerpos de Auer.

Con tinciones citoquímicas es notoria la positividad para mieloperoxidasa hasta en un 85%, pero hay patrones confusos que presentan positividad para esterases, lo que, entre otros hallazgos de más peso que mencionaremos luego, ha hecho investigar sobre el linaje mixto (monocito/neutrófilo) del promielocito [14, 15].

Toda esta heterogeneidad enzimática se encontró en un mayor número de pacientes, de acuerdo a los informes de Bennett y col. [16], quienes en un 27.9% de los promielocitos neoplásicos identificaron un patrón citoquímico monocitoide (esterases inespecíficas o inhibidas por fluoruro de sodio, NaF) combinado siempre con cierto porcentaje de positividad para mieloperoxidasa.

Los análisis inmunofenotípicos no han sido de ayuda certera para identificar el linaje, aún con ayuda de isoenzimas como butirato-esterasa o lisozima [17, 18]. El fenotipo hasta ahora más completo para el promielocito es el siguiente (de acuerdo a la MFC): HLA-Dr negativo; CD7+; CD9+; CD13+; CD33+; tdt negativa [19].

#### D) Biología Celular del Promielocito Maligno.

El estudio de la Biología tumoral ha revelado hechos interesantes, indagados primero en cultivos celulares y rastreados luego hasta niveles moleculares. Al respecto, los promielocitos y sus similares, las células de cultivo HL-60, han demostrado ser un sistema casi arquetípico para estudiar la diferenciación celular en las neoplasias.

Sometidas a diferentes agentes inductores (ver cuadro A), las células HL-60 se diferencian hacia cualquiera de los dos tipos celulares, neutrófilo o monocito, dependiendo del agente utilizado [20, 21].

Dichos inductores actúan durante un período de dos divisiones celulares, siendo hasta la segunda de ellas cuando se define el fenotipo (ver figuras A y B) [22].

La inducción durante las dos divisiones celulares sigue dos fases, como se ha descrito en la diferenciación granulocítica con 6-tioguanina (6-TG), primero ocurre una inhibición del crecimiento y luego se activa la diferenciación funcional y morfológica [23].

Se requiere también que los sistemas de mensajeros intracelulares a través de cinasas de proteínas funcionen adecuadamente. Por ejemplo, la expresión correcta de la subunidad reguladora R1-alfa de una cinasa dependiente de AMPc es fundamental para que se detenga el crecimiento de células HL-60 y se diferencien a serie monocítica [24].

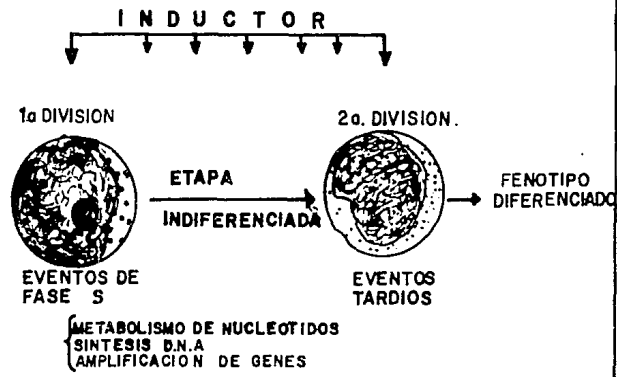
Estos fenómenos de diferenciación tienen naturalmente

**DIFERENCIACION DEL PROMIELOCITO**

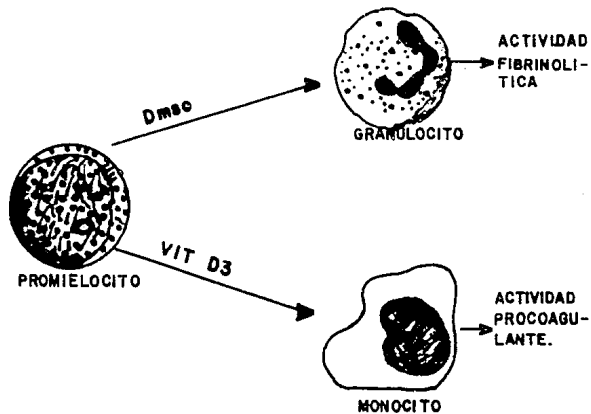
---

- 1) BROMODEOXIURIDINA
  - 2) DIMETILSULFOXIDO
  - 3) 1.25 DIHIDROXIVITAMINA D3
  - 4) BUTIRATO DE SODIO
  - 5) 6-TIOGUANINA
  - 6) ACIDOS RETINOICOS (cis. trans)
- 

Cuadro A. Agentes Inductores.



..Fig. A : FASES DE LA DIFERENCIACION CELULAR INDUCIDA POR AGENTES QUIMICOS



**Fig. B** DIFERENCIACION Y ACTIVIDAD HEMOSTATICA DEL PROMIELOCITO

DMSO: DIMETILSULFOXIDO  
 VIT D<sub>3</sub> 1,25 DIHIDROXIVITAMINA D<sub>3</sub>



un sustrato molecular que mencionaremos en el próximo inciso.

Conocer estos mecanismos de diferenciación en células HL-60 fue trascendental para investigar la fisiopatogenia de la coagulopatía en las LPA, pues en un brillante experimento, se comprobó que la diferenciación hacia monocito provocaba una actividad procoagulante, mientras que la diferenciación granulocítica producía actividad fibrinolítica [21].

#### E) Biología Molecular del Promielocito Maligno.

Las LPA tienen en un 70 a 90% de los casos una característica citogenética que no se ha identificado en ninguna otra neoplasia [25], y es la traslocación recíproca y balanceada de los brazos largos en sus bandas q22 y q21 de los cromosomas 15 y 17 respectivamente, simbolizada  $t(15;17)(q22;q21)$  [26].

En esta alteración, el gen RAR-alfa del cromosoma 17 se reorganiza y trasloca para unirse a la unidad de transcripción myl del cromosoma 15 [26]; fusión que da origen a una proteína anormal RAR-alfa [27, 28].

Invariablemente todos los promielocitos anormales presentan por lo menos algún reorganización en los genes descritos [29]: del gen RAR-alfa se encuentran en el 92% de los casos y del gen myl en el 73%, pudiendo existir reorganizaciones de ambos o de sólo uno de ellos.

Los RNAm transcritos por la fusión de los genes implicados son aberrantes y se ha demostrado por secuenciación de nucleótidos que el gen RAR-alfa se trunca en su primer intron, por lo que la proteína producida tiene una región N-terminal borrada y/o sustituida [30].

El gen RAR-alfa codifica una proteína que es receptora intracelular para el ácido retinoico, el cual regula el desarrollo embrionario y la diferenciación celular de varios sistemas [31].

Conociendo que el receptor RAR-alfa está truncado desde su transcripción, es fácil suponer que el defecto en la diferenciación se origina desde la transactivación genética que incita un receptor intracelular anormal, como sucede con los receptores esteroideos que tienen alteraciones.

Sin embargo, estos receptores responden con ciertos isómeros del ácido retinoico [32, 33], lo cual ha tenido implicaciones terapéuticas, como veremos más adelante.

Otra observación con células HL-60 tratadas con diferenciadores es la inhibición de la expresión de los genes de mieloperoxidasa y del c-myc, la presencia de este último definitivamente asociado con la falta de diferenciación y utilizado eventualmente como marcador de la enfermedad [34].

## F) Coagulopatía en las Leucemias Promielocíticas.

Describimos ahora los novedosos ensayos utilizados para analizar una alteración hemostática. De ninguna manera se pretende revisar cabalmente los mecanismos de coagulación, ya que no es el objetivo del presente trabajo.

Las neoplasias malignas presentan coagulopatías asociadas generalmente a una hipercoagulabilidad similar a la CID [35] o, menos frecuentemente, a estados fibrinolíticos primarios. Se utiliza en la práctica clínica simplificar los defectos hemostáticos adquiridos en las Leucemias Mieloblásticas aduciendo que son debidos a trombocitopenia, hipofibrinogenemia, consumo de factores o deficiencia de alfa-2-antiplasmina (AP); eventualmente, como en el caso de la LPA, se asocia un síndrome de CID [4]. Speiser en 1990 encontro que el 90% de las Leucemias Mieloblásticas tenían niveles elevados de complejos Trombina:Antitrombina y de Dímero D, y el 50% los tenía de elastasas. Esto incitó a definir coagulopatías acompañantes de las leucemias, pero no ha sido fácil.

Uno de los principales problemas para definir una coagulopatía, es que no hay indicador de laboratorio que sea exclusivo de un evento en que se estén formando o lisando excesivamente trombos, ya sea en forma localizada o generalizada, primaria o secundaria.

En adelante, trataremos de mencionar las alteraciones de laboratorio que se conjuntan para hacer un diagnóstico nosológico y evitaremos definiciones tajantes, lo que será útil para el análisis de la coagulopatía en las LPA.

#### F.1.- Características de laboratorio en la generación excesiva de Trombina.

En toda CID que acompañe a cualquier otra entidad patológica generalmente hay un alargamiento de los tiempos de coagulación, descenso de los niveles de fibrinógeno y de la cuenta plaquetaria, aumento de los productos de fragmentación del fibrinógeno, pero fundamentalmente de la fibrina (PFFbg y PFbn, respectivamente) y disminución de factores (V y VIII principalmente) y anticoagulantes naturales (Antitrombina III, Proteína C y antiplasmina); aunque veremos luego que ya no se consideran pruebas exclusivas ni constantemente anormales.

Más recientemente se prefieren pruebas que muestran el efecto de la Trombina, como son los complejos Trombina:antitrombina (TAT), el Fibrinopéptido A (FPA), y el Fragmento 1.2 de Protrombina (F1.2); así como pruebas que indican lisis de los trombos formados, como el Dímero D (D-D) o los fragmentos de fibrina (PFFbn). Estas pruebas tienen una mayor sensibilidad y resultan anormales en un 90% de los casos [36].

En estados sépticos o en general en padecimientos en

los cuales la fisiopatogenia involucre endotoxinas, factor de necrosis tumoral o Interleucina 1 (IL-1) [37], entre otros fenómenos humorales, se ha observado la activación de los sistemas de generación de Trombina y Fibrinolisis.

#### F.2.- Características de laboratorio en la Fibrinolisis Patológica.

La fibrinolisis en estados patológicos puede ser secundaria a la formación desmesurada de trombos, pero también se presenta como evento primario y en ambos casos el comportamiento de la plasmina parece tener sus peculiaridades. Por ejemplo, en los casos de sepsis, se encuentran niveles elevados de activador tisular de plasminógeno (tPA) al menos en su forma antigénica y no en la funcional, acompañado de un aumento de la actividad del inhibidor tipo 1 del activador de plasminógeno (PAI-1) [38] y de niveles normales o discretamente bajos de antiplasmina. En una Fibrinolisis primaria se observa una situación opuesta, muy parecido a lo que ocurre en la LPA. Una prueba que se utiliza con bastante frecuencia para determinar Fibrinolisis primaria es la Lisis de Euglobulinas, cuyo tiempo se acorta notablemente. Sin embargo, con ella no es fácil detectar la fibrinolisis generada a través del activador tipo uroquinasa del plasminógeno (uPA), razón por la cual en las LPA probablemente no se presenten Tiempos acortados de Lisis, según veremos después.

La evaluación del sistema fibrinolítico requiere el análisis de sus diversos componentes: activadores e inhibidores del plasminógeno, libres o en complejos, niveles de plasminógeno y de complejos Plasmina:antiplasmina, productos líticos de fibrina y de fibrinógeno. Eventualmente habrá que establecer correlaciones, razones o proporciones entre dichos componentes para determinar un evento predominante o primero en tiempo, trombosis o fibrinólisis [39].

En situación similar a lo que ocurre con la Trombina cuantificada como complejo TAT, el método ideal para evaluar la fibrinólisis podría ser la cuantificación de complejos Plasmina:antiplasmina (PAP) de vida media aproximada de 12 horas [40, 41], ya que la plasmina libre tiene vida media muy breve.

Los diversos métodos inmunológicos utilizados se basan en la propiedad de que los anticuerpos monoclonales sintetizados para este fin, reaccionan rápidamente con complejos enzima-inhibidor (PAP, TAT). Incluso se experimenta con sistemas más inespecíficos como el ATM [42] que detecta complejos TAT, XIa:AT, Xa:AT y IXa:AT.

En cuanto sean más asequibles los ensayos para la detección de complejos, se facilitará la identificación de coagulopatías complejas [43].

### F.3.- Características de la Coagulopatía en las LPA.

Como hemos mencionado antes, la caracterización nosológica de una coagulopatía requiere del análisis secuencial de varios indicadores de laboratorio, aunque después esto no sea práctica clínica rutinaria sino que se opte por la prueba más útil, y este es el espíritu del presente trabajo.

En las LPA, las proteasas liberadas por el promielocito anormal pueden interactuar con diversos sustratos como el Fibrinógeno, la Fibrina, factores e inhibidores naturales de la coagulación y probablemente con elementos estructurales de la pared vascular, provocando tanto trombosis como fibrinólisis [44].

Gralnick y Abrell, primero, y después el grupo de Saguragawa a principios de los años 70, demostraron que los promielocitos de las LPA provocaban activación del factor X, tanto por la vía intrínseca como la extrínseca (factor tisular), fibrinólisis y actividad proteolítica inespecífica, todas ellas relacionadas con la fracción granular del lisado celular [45, 46, 47]. Luego se describió una actividad procoagulante con cisteína-proteasas [48], también se involucró a la Interleucina 1 del promielocito con la actividad procoagulante [37], y finalmente se dijo que lo que predominaba era la acción del uPA [55].

Después de varios estudios previos, Andoh y col. [49] racionalizaron su tratamiento con la idea de que al eliminar la población tumoral con quimioterapia se controlaría la

coagulopatía, catalogada entonces como CID; pero mientras hubiera lisis, habría excesiva actividad procoagulante, por lo que era necesario utilizar entonces Heparina, tratando de mantener al mismo tiempo, niveles óptimos de Antitrombina III (ATIII).

En las LPA, la generación excesiva de Trombina se hace evidente principalmente por la elevada cantidad de complejos TAT y de Fragmento 1+2, mismos que correlacionan positivamente con los niveles de Fibrinopéptido A, sólo que se prefiere a aquéllos porque tienen una vida media más larga (12 horas) y no aumentan con la edad [50, 51].

Medir complejos TAT ayuda a la definición de un estado hipercoagulable, pero resulta más práctico y sensible cuantificar el D-D o el Fragmento E [52].

Las primeras objeciones que se hicieron al concepto de CID en las LPA fueron que no existía disminución de inhibidores naturales como la ATIII y la Proteína C, además de que la hipofibrinogenemia era muy severa y se presentaba tempranamente. Actualmente se discute la importancia de la disminución de inhibidores como característica de la CID, pues se ha visto que, si el Hígado funciona adecuadamente, aquéllos se alteran poco o nada [53]. De cualquier forma, todo esto ha conducido a que se hable de Fibrinolisis anormal en las LPA, surgiendo un problema conceptual con implicaciones terapéuticas.



A pesar de las dificultades técnicas, se ha podido demostrar en las LPA, disminución de la actividad del PAI-1 (de origen endotelial) [54], escasa actividad del tPA [55] y fibrinólisis generada por el uPA secretado por los promielocitos [56].

De acuerdo a esto último, quizá sería interesante determinar la actividad del PAI-2, principal inhibidor del uPA, recordando que puede provenir de promielocitos y monocitos, sobre todo en respuesta a estímulos como el D-D, que tampoco se ha estudiado adecuadamente en las LPA [57]. Agreguemos que el PAI-2 se ha encontrado elevado en ciertos tumores sólidos y otras entidades [58, 59] además de embarazos (donde tiene origen placentario), por lo que se justifica aún más su análisis.

La fibrinólisis activada por uPA, se ve acompañada por una importante disminución de la antiplasmina y de plasminógeno y además las hipofibrinogenemias no se explican por actividad de proteasas inespecíficas, como lo demostró Speiser [39] en LPA y Leucemias Monocíticas agudas; sugiriendo, por otro lado, un aumento de complejos antifibrinolíticos (PAP).

La deficiencia de antiplasmina se ha utilizado como indicación y medio de control de terapia antifibrinolítica, sobre todo cuando su actividad cae por debajo de niveles de 50 o 60% [60, 61].

La reducción tan marcada de la actividad de

antiplasmina llegando hasta 0 en el periodo de lisis por quimioterapia, mientras que la ATIII permanecía inalterada, fue una de las características que más llamaron la atención para reevaluar el problema [62].

Sin poder definir todavía el tipo de coagulopatía, los clínicos se dieron cuenta de que la situación más crítica para el paciente estaba en relación con la deficiencia de la antiplasmina [63].

Los trabajos que indagaron la baja de este inhibidor encontraron inicialmente que todo era debido a una eliminación aumentada del mismo [64]. Pero, por otra parte, al medirse los complejos PAP, estos se encontraron elevados, por lo que, independientemente de la depuración hepática, se explicaba la baja del inhibidor libre [65].

Existiendo esta deficiencia adquirida de antiplasmina, se planteaba la duda de si la Fibrinolisis era secundaria a una CID, en todo caso atípica, o si se trataba de un fenómeno independiente que progresaba hasta una Fibrinogenolisis grave. Investigadores Japoneses compararon los productos de fragmentación totales de fibrina y fibrinógeno con los Dímeros D de la Fibrina, utilizando anticuerpos monoclonales, y encontraron diferencias notorias entre la CID clásica y la coagulopatía de las LPA, siendo en estas últimas el componente fibrinolítico uno de los fenómenos más marcados, sobre todo asociado a la deficiencia de antiplasmina [61].

El grupo de Takahashi encontró que, comparada con otras coagulopatías, la de las LPA presentaba los niveles más altos de PAP, razones bajas de TAT/PAP, y los usuales niveles bajos de antiplasmina e hipofibrinogenemia; todo lo cual correspondía a un estado fibrinolítico severo [66].

En cuanto a otros inhibidores fibrinolíticos, diremos que no hay estudios que evalúen la Nexina, el PAI-3 (de origen y función inciertos), y la alfa-1-antitripsina y alfa-2-macroglobulina no han mostrado alteraciones significativas [67].

Hemos seguido la trayectoria de los principales trabajos que han llevado a cambios de concepto de CID a Fibrinólisis como coagulopatía de las LPA. Ninguno de ellos logra valorar global y comparativamente las pruebas de laboratorio que apoyen irrefutablemente uno u otro diagnóstico de los arriba mencionados, mucho menos que determinen qué tipo(s) de ensayo(s) resulta(n) ser util(es) para la práctica clínica.

Conforme se diseñen pruebas funcionales que se aproximen más a lo que sucede en el organismo cuando se forma o se destruye un trombo, será más fácil el discernimiento clínico.

Resulta poco práctico y muy costoso evaluar una coagulopatía en todos sus componentes tanto de Generación de Trombina como de Fibrinólisis. Nuestra propuesta es que, en

el caso de las LPA, se determinen secuencialmente: a) los principales activadores e inhibidores de ambos sistemas; b) niveles y proporciones de complejos PAP y TAT; y c) niveles de productos líticos de Fibrina y Fibrinógeno.

Si a todo ello se le relaciona el fenotipo del promielocito, así como la caracterización de sus proteasas, será más fácil entender la fisiopatología y establecer diagnóstico y tratamiento racionales.

#### G) Estrategias en el Tratamiento de las LPA.

Considerada como una variedad (M3) del grupo de Leucemias Mieloblásticas, las LPA se han tratado con los mismos esquemas de quimioterapia, basados en el Arabinósido de Citosina y Antraciclina o Antracenediona, además del apoyo transfusional, heparina y antifibrinolíticos [3, 10, 68].

Pudieran mencionarse varios estudios efectuados para evaluación de tratamientos, pero baste decir que todos hacen hincapié en el oportuno control de la coagulopatía, determinante del pronóstico; por lo que en adelante nos enfocamos sobre este punto.

Como originalmente se hablaba de una CID, el uso de Heparina era la norma. Pero, aun cuando autores como Kantarjian y Cordonnier [11, 69] obtienen menor porcentaje de hemorragias letales, sobre todo en pacientes clasificados como

de alto riesgo, los resultados no son indiscutibles, pues se trata de revisiones retrospectivas, sin grupo de control y con diferencias importantes entre los pacientes tratados.

Ademas, si en estos primeros informes clinicos las tasas de remisión mejoraban al combinar la quimioterapia de inducción con Heparina, la tasa global de mortalidad por hemorragia no mostraba diferencias significativas [70, 71].

Fue entonces que, apoyados en los informes de la baja actividad de antiplasmina, los clinicos se lanzaron a evaluar la respuesta con antifibrinolíticos (ácido epsilon-aminocaproico, ácido tranexámico, aprotinina) e inhibidores de proteasas (como el Mesilato de Nafamostato y de Gabexato), sin dejar de utilizar la reposición transfusional [72-77].

Con estas últimas estrategias se obtuvieron resultados muy buenos, incluso sugiriéndose ahora el tratamiento con concentrados plasmáticos de antiproteasas. Pero, como toda tendencia revolucionaria, no todos los clinicos aceptaron este manejo y continuaron con el tradicional. Quizá uno de los factores que más apoye el uso de antifibrinolíticos y antiproteasas es que se reducen considerablemente los requerimientos transfusionales. Hay otros estudios que utilizan, junto con la aprotinina, altas dosis de esteroides (buscando inhibir la liberación de proteasas) o plasmaféresis [78].

Considerando todos los sistemas de tratamiento hasta

ahora descritos, el estudio con mayor número de pacientes corresponde al grupo Italiano de Rodighiero [73]. Ellos informan resultados de 94 pacientes tratados con Heparina, 67 con antifibrinolítico y 107 sólo con apoyo transfusional, sin lograr demostrar ventaja de algún grupo en cuanto a la incidencia de muertes tempranas por hemorragia o de la sobrevida en general.

Recientemente se observaron tasas del 64 al 96% de remisión completa en pacientes con recaída, utilizando agentes diferenciadores derivados del ácido retinoico, sin provocar aplasias medulares severas y sólo ocasionalmente cuadros hiperleucocitósicos de fácil control [79, 80, 81]; peculiaridad de este tipo de leucemias, explicada por la diferenciación celular estimulada a través de receptores intracelulares (RAR-alfa) homólogos a los tiroideos [82], que antes hemos mencionado.

El uso del ácido trans-retinoico, además de promotor como terapia, sugiere nuevas interrogantes, pues, aunque se menciona que corrige la coagulopatía rápidamente, no se puede asegurar que en el transcurso de la diferenciación inducida no haya actividad de las proteasas provenientes de promielocitos en proceso de diferenciación, lo que sería crítico y requeriría de ayuda con quimioterapia convencional y tratamiento hemostático. Aun más, no obstante se sabe que se logra remisión citogenética, falta corroboración a nivel molecular de la inhibición de genes responsables de la síntesis de proteasas.

#### H) Experiencia en el Hospital de Especialidades del Centro Médico La Raza. [83]

En el Departamento de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico La Raza se ha registrado una frecuencia de 22% de casos de LPA dentro del grupo de las Leucemias Mieloblásticas, presentándose predominantemente durante la temporada invernal (datos aún no publicados).

A semejanza de lo que se observa en otros centros hospitalarios, en este Hospital, la coagulopatía se presenta en el 80% de las LPA, con una duración media de  $7.9 \pm 6$  días; siendo las pruebas de laboratorio más significativas en el inicio y durante la evolución, el alargamiento del tiempo de trombina, el aumento de los productos de fragmentación de fibrinógeno/fibrina y los niveles bajos de fibrinógeno. Se observa además en forma constante, disminución de la antiplasmina y valores normales de ATIII, alfa-2-macroglobulina y alfa-1-antitripsina. Los factores plasmáticos que más frecuentemente están disminuidos son el VII y el X, y en menor grado, casi nunca significativamente, el V y el VIII.

Otro hallazgo interesante, que sólo algunos autores han considerado, es que no se acortan los tiempos de lisis de Euglobulinas, pero sí los de lisis de coágulo de sangre total. La explicación probable que antes ya habíamos esbozado, es que el uPA no se separa en la fracción euglobulinica, y este resulta ser el responsable de la fibrinolisis en las LPA [56].

La terapia que se ha utilizado en nuestro Departamento consiste en quimioterapia intensiva con Arabinósido de citosina y Mitoxantrone, apoyados por la sustitución oportuna de fibrinógeno y demás factores que se consuman. El uso de antifibrinolítico (ácido epsilonaminocaproico -EACA-) se ha reservado para aquellos casos en que la hemorragia se vuelve de difícil control y/o el fibrinógeno desciende a un ritmo muy acelerado. Sin embargo, es casi rutinario el uso de EACA porque se ha observado en la práctica que ha disminuido notoriamente la muerte temprana por hemorragia.

Las transfusiones de fibrinógeno han resultado pilar en el tratamiento, pues su lisis es aceleradísima. Hemos visto que, a pesar de estar transfundiéndolo periódicamente, no es fácil lograr niveles óptimos hemostáticos, sobre todo durante el climax de la enfermedad, es entonces que el EACA resulta muy útil.

Se ha preferido limitar al máximo las transfusiones de plasma, que por otra parte no ha sido indispensable, sin embargo habrá que revalorar su utilidad no como fuente de factores sino de antiproteasas (ATIII, antiplasmina, antitripsina y alfa-2-macroglobulina), que resulta ser uno de los enfoques modernos de tratamiento en los principales Hospitales del mundo, preferentemente utilizando concentrados [84].

Como parte de un proyecto del estudio de la Biología y Fisiopatología de las LPA iniciado en nuestro Departamento y con base en todo el marco teórico que hemos expuesto antes, se pretende comparar el efecto terapéutico de bloquear tanto la



generación de Trombina como la Fibrinolisis contra el manejo hasta ahora utilizado de transfusiones y EACA. Para llevar a cabo lo primero se propone utilizar anticoagulación cumarínica y efecto anti-Xa de Heparina [85], tratando de bloquear tanto la Via Extrínseca como la Intrínseca, al mismo tiempo que se impide el efecto de la plasmina con el EACA.

En el presente trabajo presentamos resultados preliminares pero significativos de los primeros casos que se han manejado con los principios expuestos.

## 11. PACIENTES Y METODOS

Desde marzo de 1990 hasta diciembre de 1991 se analizaron y trataron seis pacientes con diagnóstico de LPA de acuerdo a criterios de la FAB [1]. Cinco de ellos con diagnóstico reciente y uno con primera recaída después de seis meses de remisión completa, pero que por otra parte presentó en el momento de la confirmación de su recaída, las mismas alteraciones de coagulación que los otros pacientes.

Todos los estudios llevados a cabo en adelante, se atuvieron a la Declaración de Helsinki para Investigación Biomédica en seres humanos y además el paciente sometido a tratamiento protocolizado debió consentirlo por escrito.

Los pacientes entraron directamente al protocolo de Quimioterapia Intensiva para Leucemias Mieloblasticas, vigente en el Departamento de Hematología. Dicho protocolo consiste en cuatro a seis infusiones de Arabinósido de citosina (con dosis por infusión durante cuatro horas de  $1.5 \text{ g/m}^2$  de superficie corporal), separadas entre si por intervalos de 12 horas, y Mitoxantrone ( $10 \text{ mg/m}^2 \text{ SC}$ ) en bolos intravenosos a las 12 y a las 36 horas de haberse iniciado el ciclo de quimioterapia.

A las muestras celulares de cada paciente (de sangre periférica y médula ósea) se les determinó a través de tinciones citoquímicas la actividad de mieloperoxidasa y de esterases inespecíficas alfa-naftilacetato (ANAE) y cariotipo.

Para los fines del trabajo que ahora describimos, como parte del protocolo de analisis y tratamiento de la coagulopatía, se siguieron los lineamientos siguientes.

A) Estudios relacionados al estado hemostático.

1.) Se recolectaron los especimenes de sangre en Trombotubos de vidrio con Citrato de sodio al 3.8% como anticoagulante, en relación de volumen 9:1 (sangre:anticoagulante), con un mínimo de 5 ml de sangre obtenida por punción cuidadosa de vena periférica. Estas muestras se centrifugaron a 3000g durante diez minutos y a temperatura ambiente. El plasma así separado se colocó en tubos de plástico poliestireno para trabajar inmediatamente o para congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$  un mínimo de seis alicuotas (0.5 a 1 ml) y tres de ellas se conservaron en una solución al 2.5% (peso/volumen) de EACA, para lograr una proporción de 5% (vol/vol) con el plasma. Se procuró trabajar con muestras que no hubieran estado mas de dos meses congeladas.

2) A partir del primer día de hospitalización, diariamente y hasta el periodo de hipoplasia medular postquimioterapia o hasta comprobarse corrección de la coagulopatía, se efectuaron las siguientes pruebas de laboratorio:

a) Tiempo de Protrombina (TP), Tiempo de Tromboplastina Parcial activada (TTP<sub>a</sub>) y Tiempo de Trombina,

de acuerdo a técnicas habituales.

b) Indicadores básicos para la conducción de este protocolo: Fibrinógeno por método de Clauss (Apéndice 1), cuantificación de alfa-2-antiplasmina (Apéndice 2) y de Dímero D (Apéndice 3).

3) Se congelaron alicuotas en los siguientes tiempos:

- a) Estado basal o inicio de la coagulopatía.
- b) Aplicación de Quimioterapia: inicio, mitad del ciclo y en el día en que se presentó la hipoplasia medular.
- c) Días críticos de la coagulopatía, a juzgar por las manifestaciones clínicas. Fibrinógeno < 100 mg/dl, antiplasmina < 60% de act. o Dímero D > 1 mg/ml.

4) Ensayos efectuados con las alicuotas conservadas:

- a) Actividad de Antitrombina III por técnica enzimática sobre sustrato cromogénico (Apéndice 4).
- b) Fragmento 1+2 de Protrombina por método inmunoenzimático (Apéndice 5).
- c) Complejos Trombina:Antitrombina por método inmunoenzimático (ATM, Apéndice 6).
- d) Niveles de inhibidores de activadores de plasminógeno. Efectuamos PAI-1 por m. inmunoenzimático (Apéndice 7).
- e) Productos de Fragmentación Fibrina/Fibrinógeno Totales (PFT) por m. inmunoenzimático (Apéndice 8).
- f) Productos de Fragmentación de Fibrina (PFFbn) por m. inmunoenzimático (Apéndice 9)

g) Productos de Fragmentación de Fibrinógeno (PFFbg) por m. inmunoenzimático (Apéndice 10).

#### B) Terapia Transfusional.

Se mantuvo a los pacientes con niveles mínimos de 50 mil plaquetas/mm<sup>3</sup> y 10 g de Hemoglobina/dl de sangre con transfusiones oportunas de plaquetas y paquetes globulares.

De acuerdo a los niveles de fibrinógeno y otros factores e inhibidores de la coagulación, se decidió utilizar crioprecipitados o plasma, hasta alcanzar y mantener niveles aceptables.

Para mantener el fibrinógeno en niveles de 150 mg/dl se utilizaron crioprecipitados con un aporte de 200 mg/dl por bolsa y calculando el déficit de acuerdo a la fórmula:  

$$[\text{vol. plasmático} \times (1 - \text{Hematocrito})] \times (150 - \text{Fibrinógeno real})$$

#### C) Tratamiento de la Coagulopatía.

A los pacientes se les escogió aleatoriamente para formar dos grupos:

GRUPO A: Recibiendo Anticoagulación oral, Heparina, Antifibrinolítico y Terapia transfusional.

GRUPO B: Recibiendo Antifibrinolítico y Terapia transfusional.

ESTA  
 SALIR  
 TENG  
 DE LA  
 BIBLIOTECA  
 DE  
 GEDE

A continuación mencionamos los criterios para uso de medicamentos hemostáticos.

a) ANTIFIBRINOLITICOS.

- 1) Antiplasmina < 60% de actividad.
- 2) Fibrinógeno < 100 mg/dl.
- 3) Hemorragia grave no explicable por déficit de factores o de plaquetas.

Se utilizó ácido epsilon-aminocaproico ("AMIKAR", de laboratorios LEDERLE) con el siguiente esquema: Impregnación con un bolo IV calculado a 100 mg/Kg de peso corporal y luego infusión continua a razón de 1 g/hora; todo ellos en diluciones apropiadas para cada paciente con solución glucosada al 5%.

La suspensión de la infusión se hizo en cuanto se normalizaron los criterios arriba expuestos.

b) ANTICOAGULANTES.

De acuerdo a los valores de Dímero D (D-D) con o sin manifestación clínica se aplicaron los siguientes ensayos terapéuticos:

- 1) D-D de 1 a 3 mg/ml: Heparina de bajo peso molecular (HBPM), vía subcutánea, 7500 Unidades Chouay c/24 horas [86].

- 2) D-D > 3 mg/ml: HBPM subcutánea, 7500 U Chouay c/12 horas y Acenocumarina, 4 mg/día VO, con ajuste

de dosis hasta obtener una actividad de factor VII en valores del 10%.

Se utilizó HBPM donada por los Laboratorios SANOFI, "FRAXIPARINE" (Lab. Chouay, Paris, Francia).

La vigilancia del efecto de estos anticoagulantes se llevó a cabo con la determinación de Actividad Heparínica anti-Xa (Apéndice 11), TT y TTPa, así como TP con plasma deficiente en factor VII.

### III. RESULTADOS

Los seis pacientes estudiados tuvieron diagnóstico de LPA basado en criterios clínicos, citomorfológicos y corroborados con citogenética que en el total de casos mostró la  $t(15;17)$ . La edad promedio de los pacientes fue de 30 años y la relación hombre:mujer fue de 2:1, tanto en estadística global como por grupo de tratamiento. Con tinción Wright no se identificó ninguna variante. Cada caso presentó positividad para la mieloperoxidasa en valor promedio de 80% y para esterasa inespecífica (ANAE) en promedio de 10%. No se encontró relación entre los hallazgos citomorfológicos y las alteraciones de la coagulación.

En el momento de ingresar a este protocolo todos los pacientes presentaban Trombocitopenia ( $20.16 \pm 18.46 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) pero sólo dos de ellos tuvieron púrpura con sangrado de mucosas. Todo esto fue corregido durante el seguimiento con transfusión de plaquetas. Luego de esto, ningún paciente en ningún otro momento presentó evidencia clínica de hemorragia o trombosis.

No hubo pacientes con sepsis o insuficiencia orgánica durante el periodo de observación para este protocolo.

Para comparar los resultados de las pruebas efectuadas, utilizamos los valores normales obtenidos en nuestro laboratorio con poblaciones de sujetos normales y se indican en el cuadro I.



V A L O R E S   N O R M A L E S

---

F 1+2	0.24-1.02 ng/ml
ATM	20-48.2
ATIII	85-111 %
PFFbn	194.4-268 ng/ml
D-D	< 0.5 mg/ml
PFFbg	191-241.4 ng/ml
PFl	386.8-710.6 ng/ml
Fbg	145 a 380 mg/dl
PAI-1	8-28 ng/ml
alfa-2-AP	88-114 %

---

Cuadro 1. Valores (rangos) obtenidos en el

laboratorio con sujetos sanos.

( $\bar{x} \pm 1D.E.$ )

En un análisis previo de resultados determinamos los valores más representativos en la evolución de los pacientes, quedando los siguientes períodos a evaluar:

- 1) Basal: ensayos tomados al inicio de la enfermedad.
- 2) Lisis Máxima: valores más altos durante el ciclo de quimioterapia.
- 3) Hipoplasia: los valores que se encontraron cuando la Médula Ósea del paciente presentaba < 10% de promielocitos anormales (en todos los casos se logró al 7º día posquimioterapia).

a) Verificación de la anticoagulación.

Mediante control diario de laboratorio, se corroboró que todos los pacientes que tomaran anticoagulante oral tuvieran un nivel de Factor VII de aproximadamente 10%. El tiempo promedio en que se logró dicho objetivo fue de 48 horas con dosis diarias de 4 mg de acenocumarina VO y con ajustes pertinentes. Ningún paciente presentó complicaciones hemorrágicas.

Para control de Heparina se utilizó el método colorimétrico STACHROM (Diagnostica Stago) (Apéndice 11); determinando el efecto a las tres horas post-aplicación y con efecto cuantificado entre 0.10 y 0.20 UI anti-Xa/ml; siempre con alteraciones de IP y TTPa (datos no mostrados).

b) Pruebas rutinarias de coagulación.

Al inicio, todos los pacientes presentaron alargamiento del TT, 66% alargamiento del IP y TTPa. Después,

en el grupo A, todos los tiempos, como se esperaba por el tratamiento anticoagulante, se encontraron alargados, corrigiéndose cuando se suspendió el tratamiento, a excepción del TT que persistió elevado con relación a la elevación de los productos líticos, pero corregido cuando el fibrinógeno alcanzó sus niveles óptimos.

Del grupo B, 83% presentaron alargamiento del TP y 66% del TTPa durante la evolución y hasta el periodo de Hipoplasia; nuevamente, la prueba que persistió más tiempo alterada fue el TT.

c) Indicadores de la Generación de Trombina y de Fibrinolisis.

Al inicio de la enfermedad se presentan alterados todos los valores de las pruebas, a excepción de la ATIII, que se mantuvo normal durante toda la evolución.

En la Tabla 1 se presentan los rangos de confianza del 95% para todas las pruebas en el total de pacientes. En la Tabla 2 se presentan las mismas pruebas pero con rangos por grupo ( $P < 0.05$ ). No se demostraron diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ , U de Mann-Whitney) entre ambos grupos, excepto para F1.2 y ATM, pero esto no significó nada una vez establecido el tratamiento y hecho el seguimiento por periodos.

La Tabla 3 muestra que en el periodo de IISIS máxima hay un discreto aumento de los líticos de fibrinógeno y la baja actividad de antiplasmina se hace más notoria; no hay número suficiente de eventos para obtener significación estadística.

La ATIII persiste en valores normales, pero F1.2 y ATM tienden a disminuir, aunque persisten en valores elevados. En ambos grupos la tendencia es hacia la corrección, se dan los rangos de confianza ( $P < 0.05$ ), pero la prueba U de Mann-Whitney no muestra diferencia significativa comparando ambos grupos.

Durante la Hipoplasia postquimioterapia hay una gran amplitud de valores, pero todos descienden notablemente. Se observa que son tres los resultados que más dramáticos cambios tienen, el D-D, la antiplasmina y el fibrinógeno. Se indican rangos con una D.E., pero no hay diferencia estadística entre ambos grupos (U de Mann-Whitney,  $\alpha = 0.05$ ).

La evolución de la coagulopatía en cada uno de los grupos, se aprecia en las Figuras 1 y 2, donde se correlacionan gráficamente los indicadores más representativos. Donde fue posible se graficó promedio más una D.E.

En las tres etapas y en cada grupo, con la técnica de microELISA, hay correspondencia entre la suma de líticos de fibrina y de fibrinógeno con el resultado obtenido con el ensayo para totales. Además, se puede confiar en los resultados de estas pruebas pues las relaciones ponderales entre ambos tipos de líticos se mantuvieron dentro de los límites fijados por el "kit" utilizado para no interferir con la lectura.

La Tabla 5 muestra la predominancia de productos líticos de fibrina sobre los de fibrinógeno. Se muestran razones entre ambos ensayos para determinar su peso específico.

RESULTADOS BASEALES

ENSAYO	PROMEDIO	D.E.	RANGO DE CONFIANZA
Fl+2 (ng/ml)	8.75	3.03	4.25-13.25
ATM (ng/ml)	179.60	67.21	109.06-250.14
AT III (%)	91.56	12.84	78.08-105.04
PFfBn (ng/ml)	25.70	5.43	20-31.4
J-D (ng/ml)	17.33	7.86	9.08-25.58
PFfBg (mg/ml)	11.35	4.37	6.75-15.95
J-Ft (mg/ml)	39.33	5.42	33.63-45.03
Fbg (mg/dl)	134.83	85.10	45.51-223.83
PAI-1 (ng/ml)	33.83	21.85	10.9-56.76
alfa 2AP (%)	49.63	22.03	25.78-73.48

Tabla 1.- Valores promedio y rangos de confianza para  $\alpha=0.05$  con una  $t=1.571$  (Dos colas) ( $n=6$ ).

## RESULTADOS BASALES POR GRUPO

ENSAYO	GRUPO "A"			GRUPO "B"		
	PROMEDIO	D.E.	RANGO DE CONFIANZA	PROMEDIO	D.E.	RANGO DE CONFIANZA
F 1+2 (ng/ml)	11.50	0.50	10.26-12.74	6.00	0.26	5.93-6.65
ATM (ng/ml)	223.60	63.79	65.1-382.1	135.60	37.63	42.1-229.1
ATIII (%)	86.00	3.60	77.05-94.95	97.30	17.51	53.8-140.8
PFFbn (ng/ml)	29.53	4.70	17.77-41.29	21.86	2.73	15.08-28.64
O-D (ng/ml)	19.68	12.27	n.s.	16.00	0.00	16
PFFbg (ng/ml)	10.73	2.02	5.704-15.756	11.96	6.52	n.s.
Pit (ng/ml)	43.09	2.54	36.43-49.57	35.66	5.13	22.92-48.4
Fbg (ng/dl)	120.00	112.50	n.s.	156.33	90.68	n.s.
PAI-1 (ng/ml)	37.65	27.86	n.s.	29.83	19.21	n.s.
alfa2AP (%)	41.60	32.71	n.s.	57.60	5.57	43.75-71.46

Tabla 2.- Rangos de confianza por grupo,  $\alpha=0.05$  t de dos colas

## RESULTADOS DURANTE LISIS MAXIMA

ENSAYO	GRUPO "A"			GRUPO "B"		
	PROMEDIO	D.E.	RANGO DE CONFIANZA	PROMEDIO	D.E.	RANGO DE CONFIANZA
F 1+2 (ng/ml)	6.33	1.75	2.47-11.19	3.60	2.00	n.s.
ATK (ng/ml)	167.30	45.16	55.06-279.54	232.66	118.15	n.s.
ATIII (%)	82.00	9.16	59.25-104.75	84.00	10.14	58.81-109.19
PFFbo (ng/ml)	22.59	4.02	12.11-32.57	21.30	5.70	7.14-35.46
D-D (ng/ml)	6.60	2.30	0.89-12.31	6.60	2.30	0.9-12.3
PFFbg (ng/ml)	15.26	3.03	7.74-22.78	14.30	4.04	4.27-24.33
PFC (ng/ml)	38.96	3.21	30.68-46.64	35.00	5.00	22.58-47.42
Fbg (ng/dl)	21.66	36.17	n.s.	126.66	33.04	44.58-208.78
PAI-1 (ng/ml)	16.16	4.65	4.12-28.2	46.00	33.51	n.s.
alfa2AP (%)	29.30	25.71	n.s.	55.66	3.05	48.09-63.23

Tabla 2 Rangos de confianza para  $\alpha = 0.05$  y  $t = 4.303$  (Dos colas)  
Diferencia entre grupos n.s. (U de Mann-Whitney)

## RESULTADOS DURANTE LA HIPOPLASIA POSTQUIMIOTERAPIA

ENSAYO	GRUPO "A"			GRUPO "B"		
	PROMEDIO	D.E.	RANGO DE CONFIANZA	PROMEDIO	D.E.	RANGO DE CONFIANZA
F 1+2 (ng/ml)	6.30	4.04	2.26-10.34	1.30	0.57	0.73-1.87
ATM (ng/ml)	98.60	10.06	88.54-108.66	82.33	11.23	71.1-93.56
ATI1 (%)	23.66	59.67	23.99-143.33	112.80	13.70	99.1-126.5
PPFbn (ng/ml)	12.03	10.75	1.28-12.78	6.50	3.70	2.8-10.2
D-D (ng/ml)	1.50	2.02	n.s.	2.00	3.00	2
PPFbg (ng/ml)	4.74	5.47	n.s.	1.90	1.35	0.55-3.25
Pft (ng/ml)	21.40	10.65	10.55-32.25	11.60	7.60	4-19.2
Fbg (ng/dl)	129.06	64.20	64.8-193.2	222.00	33.04	188.96-255.04
PAI-1 (ng/ml)	19.83	10.88	7.45-29.71	21.66	15.88	5.78-37.54
alfa2AP (%)	62.33	2.50	59.5-64.83	63.66	7.63	56.03-71.29

Tabla 4. Valores promedio + 1 D.E. Diferencia entre grupos N.S. (U de Mann-Whitney,  $\alpha=0.05$ )



## GRUPO A

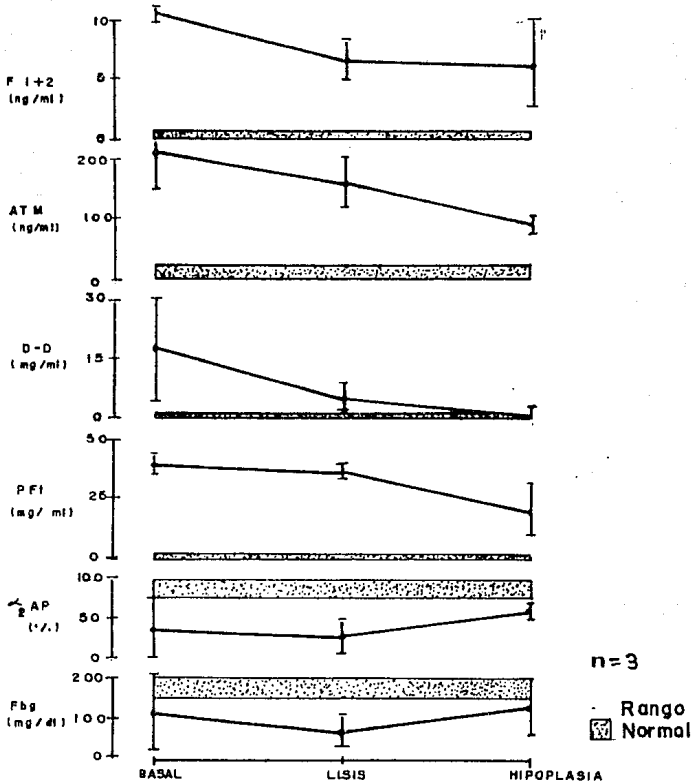


Fig. 1. Cambios en los indicadores hemostáticos durante la evolución de la coagulopatía.

## GRUPO B

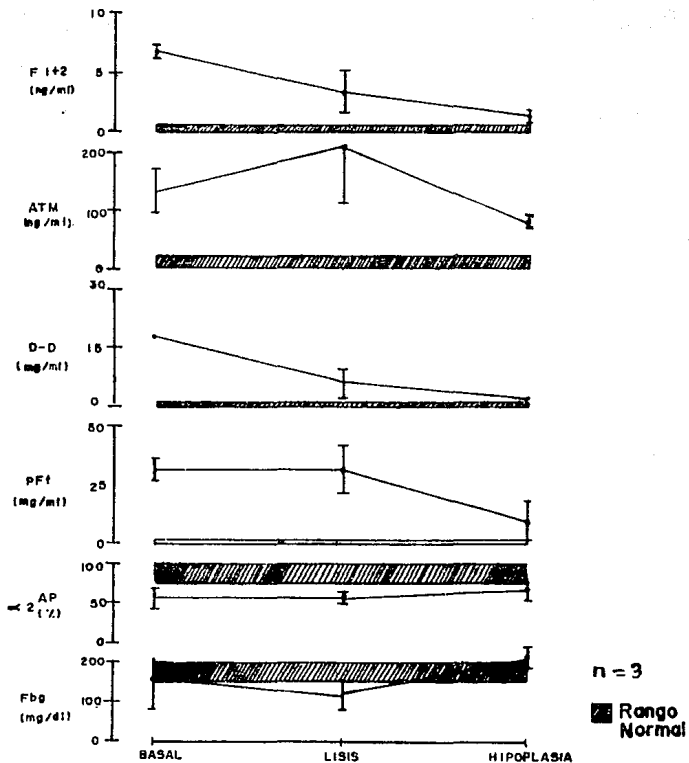


Fig. 2. Cambios en los indicadores hemostáticos durante la evolución de la coagulopatía.

**PRODUCTOS LITICOS**

MUESTRA	GRUPO "A"		GRUPO "B"	
	PFfBn:PFfBg	PFfBg:PFfBn	PFfBn:PFfBg	PFfBg:PFfBn
BASAL	2.75	0.36	1.80	0.55
LISIS	1.48	0.68	1.48	0.67
HIP-PLASIA	1.52	0.37	1.42	0.29

Tabla 5. - Razones entre los productos líticos de fibrina (PFfBn) y de fibrinógeno (PFfBg).

En las Figuras 3 y 4 se grafican los niveles de Productos líticos conforme evoluciona la enfermedad. Todos tienden a disminuir pero de cualquier forma sus valores son muy elevados en las tres etapas. El único que se aproxima a lo normal en la etapa de Hipoplasia es el Dímero-D y quizá debamos mencionar también a los líticos de fibrinógeno.

Destacamos también la amplia diferencia entre los valores del ensayo ELISA para PFfBn y los de D-D.

No se aprecia diferencia entre ambos grupos.

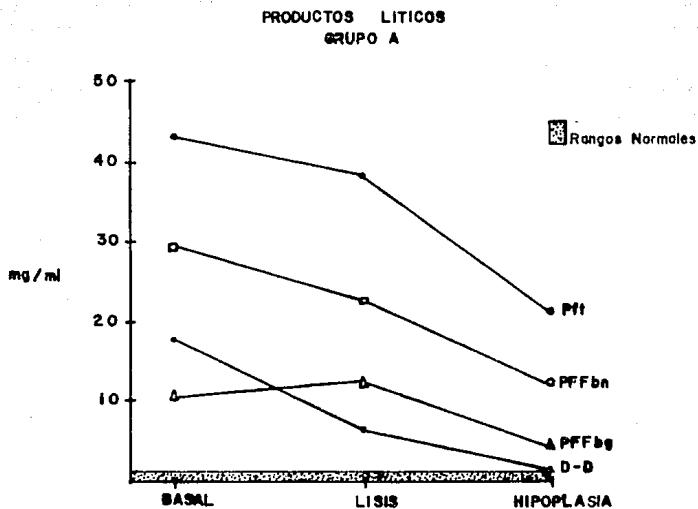


Fig. 3. Correlación de los niveles de productos líticos. (Pft:totales, PFFbn:de fibrina, PFFbg:de fibrinógeno, D-D:Dimero D).

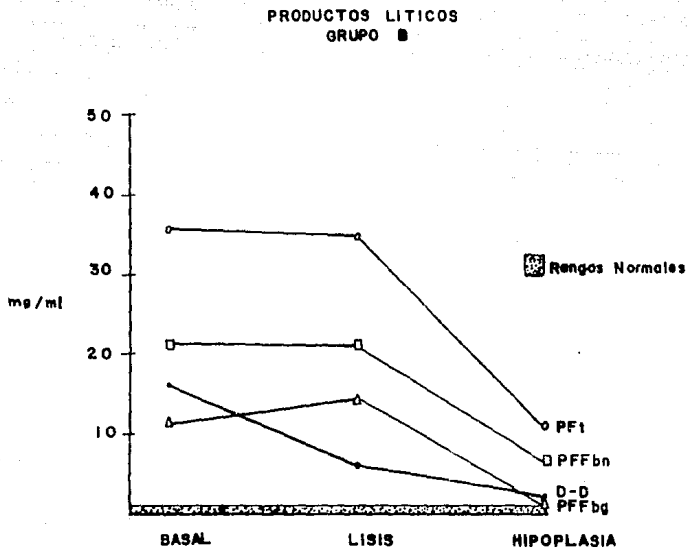


Fig. 4. Correlación de los niveles de productos líticos. (Ver clave en Fig. 3).

Finalmente, en la Tabla 6 se muestra la duración de la coagulopatía estando con tratamiento así como los requerimientos transfusionales.

El grupo A se trató durante un promedio de ocho días, mientras que el grupo B fue tratado durante  $11.6 \pm 3.7$  días, con diferencia estadísticamente significativa para  $P < 0.05$  (U de Mann-Whitney).

El grupo A no requirió transfusiones de plasma, pero no hubo suficientes datos para obtener inferencia estadística.

Los requerimientos transfusionales de crioprecipitados son similares.

	DIAS CON TRATAMIENTO	DIAS CON CRIOPRECIPITADOS		DIAS CON PLASMA	
		10 U c/12 h	10 U c/24 h	1 U c/8 h	1 U c/24 h
GRUPO A	8	3.6 +/- 2.8	1.6 +/- 1.2 (P<0.10)	0	0
GRUPO B	11.5 +/- 5.7	4.3 +/- 2.8	2.3 +/- 1.2	2.3 +/- 1.6 (P<0.10)	1.3 +/- 1.2

Tabla 6 - Duración de la Coagulopatía y requerimientos trasfusionales por día.  
(Alfa=0.05 excepto donde se indica lo contrario)

#### IV. DISCUSION

A excepción de la ATIII (siempre en valores normales) todos los casos de LPA presentaron inicialmente resultados anormales, estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ) comparado con poblaciones de sujetos sanos. Estos resultados deben compararse con los que presentan otras congulopatías para establecer diferencias nosológicas.

Nuestro estudio demuestra, como otros previos (Kahló y Avvisati) [62, 64], que la generación excesiva de Trombina, se hace evidente por los elevados valores de ATM y de F1+2, situación descrita por Bauer [84]; sin embargo, en ningún momento fue de grado tal que disminuyera los niveles de ATIII, resultado ya comentado por Avvisati et al. [63]. A este respecto sería interesante hacer comparaciones cuantitativas con caso de CID que sí presenten consumo del inhibidor.

Como fenómeno favorecedor de la trombogénesis, también encontramos aumento de la concentración (antigénica) de PAI-1, probablemente relacionado con estímulos humorales hacia el endotelio, quizá en este caso explicable por IL-1, de acuerdo a hallazgos previos [37, 38].

En la evolución de la enfermedad cuando se da tratamiento quimioterápico y hemostático, se observa la disminución de F1+2 y ATM mientras que el Fibrinógeno se eleva tendiente a la normalidad, por lo que podemos afirmar que la formación de trombos disminuye, no por consumo de sustrato, sino por el efecto del tratamiento. En relación a esto último,



no encontramos diferencia significativa de los valores secuenciales de F1-2 y ATM entre ambos grupos, así que no podemos descartar estadísticamente si la corrección de la trombogénesis se logra por el efecto del anticoagulante o por la simple reducción de la masa tumoral.

Mencionábamos que actualmente la CID se puede diagnosticar sin que se presente necesariamente consumo de inhibidores; sin embargo, probablemente sea más útil hablar de diferencias cuantitativas en las alteraciones entre la LPA y otras coagulopatías, que generalizar dentro de un mismo concepto, porque ello puede determinar un tratamiento.

Cuando se utilizó anticoagulación (efecto comprobado por laboratorio), la coagulopatía duró menos días ( $P < 0.05$ ) y a diferencia de otros autores como Hoyle [71], no se utilizó plasma. Inferimos que mientras haya niveles adecuados de inhibidores como la ATIII, el efecto de heparina está asegurado. No obtuvimos significación estadística para la diferencia en requerimientos de plasma, pero en cuanto al fibrinógeno, es evidente que no se puede prescindir de él, cualquiera que sea el tratamiento de base.

Es necesario seguir prospectivamente el uso de anticoagulación, porque la utilidad pareciera indiscutible ante los valores tan altos de F1-2 y ATM. Con el tratamiento que proponemos se pretende bloquear la generación de Trombina, tanto por vía intrínseca como por vía extrínseca, fundamentado en los conocimientos actuales de la trombogénesis en estados cancerosos.

Debemos advertir que utilizamos Heparina de bajo peso molecular, tratando de lograr sólo efecto antiXa, disminuyendo el riesgo hemorrágico. Las dosis empleadas surgieron de la experiencia previa que en nuestro Departamento teníamos cuando tratábamos de mantener niveles efectivos constantes, sin embargo, la determinación de dicho efecto fue difícil con el método utilizado, circunstancia que puede limitar la interpretación de resultados y aún la utilización del medicamento. En general, sólo podemos decir que se puede usar cualquier tipo de Heparina, siempre y cuando se lleve un adecuado control de laboratorio.

La actividad fibrinolítica se demuestra por los elevadísimos niveles de productos líticos desde el inicio de la enfermedad. Esto se confirma con el consumo de antiplasmina, llegando a su climax durante el periodo de máxima lisis, fenómenos observados en estudios previos [62, 64]. Aunque nosotros no lo determinamos se ha establecido previamente que esta reducción se acompaña del aumento de complejos PAP [65].

La elevación de D-D y de PFFbn se explica parcialmente por la fibrinólisis secundaria a la generación de Trombina, pero es muy probable que una proporción muy alta de dichos líticos se produzcan primariamente por la actividad fibrinolítica del promielocito, tal como lo demostró Bennett [56] en condiciones similares a las nuestras.

La diferencia cuantitativa entre PFFbn y D-D debe definirse ya que, aunque es de esperarse por el diferente

principio de las técnicas (ELISA y aglutinación de partículas de látex), también pudiera ser por la diversidad de productos detectados; por ejemplo, la prueba de PFFbn no sólo detecta Dímero D sino también una gran cantidad de fragmentos no entrecruzados.

Los productos líticos del Fibrinógeno se encuentran elevados desde el inicio de la enfermedad y, aunque no se logra obtener significado estadístico, en las Figuras 3 y 4 se observa un tendencia a elevarse más durante la lisis. Esto apoya la teoría de las sustancias fibrinolíticas liberadas por el promielocito. Congruente con la evolución de los PFFbg, vemos los cambios de los niveles de Fibrinógeno.

Cabe hacer notar que en ambos grupos se mantuvo el Fibrinógeno en niveles mínimos hemostáticos con ayuda de transfusiones y antifibrinolíticos, de otra manera, difícilmente se hubiera controlado el riesgo hemorrágico. Entre ambos grupos no hay diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) en cuanto al requerimiento de crioprecipitados.

Por otra parte, en ambos grupos, las razones PFFbn:PFFbg son mayores que sus inversos, lo que indica predominio de la lisis de Trombos en múltiples fragmentos, no sólo el D-D. Esto es un hallazgo hasta ahora no explicado, pero en oposición teórica a los resultados de Okajima [61], quien definió una Fibrinogenolisis por la elevada cantidad de productos líticos totales, en comparación con moderados aumentos del D-D. Nosotros también observamos excesiva Fibrinogenolisis, pero predominan los líticos de fibrina para los cuales utilizamos una metodología más sensible por los

anticuerpos monoclonales.

En estudios prospectivos con mayor número de pacientes deberán correlacionarse todos estos datos con las altas razones PAP/TAT ya descritas [65, 66]. Nuevamente, proponemos que las diferencias con otros padecimientos, quizá sólo sean dadas en la magnitud de la alteración de todas las pruebas que hemos mencionado.

Si observamos los valores de los principales ensayos mostrados en las Figuras 1 y 2, pareciera existir correlación, es muy probable que así sea, como lo ha demostrado Bauer [50], pero son pocos nuestros casos para obtener una verdadera significación estadística.

En el periodo de hipoplasia medular, todos los indicadores tienden a la normalidad, pero es más notorio para el D-D, la antiplasmina y el fibrinógeno.

Durante el seguimiento que hicimos, comprobamos que clínicamente (de acuerdo a evolución y tratamiento) correlacionan muy bien los 3 indicadores señalados, no efectuamos cálculo de coeficientes de correlación porque preferimos un mayor número de casos a mayor número de determinaciones en pocos casos, pero para nuestra práctica ya es una rutina utilizar a pruebas tan simples como el D-D en el manejo de LPA, algo que hasta ahora no había sido mencionado en trabajos previos.

En las gráficas observamos que pruebas como la ATM y líticos persisten elevados aun en el periodo de hipoplasia, no obstante van en franca caída a la normalidad. En cinco casos todos los valores se normalizaron en los días siguientes (datos no mostrados), lo que significa una vida media más o menos prolongada, por lo que es necesario estudiar la depuración de estos productos, sobre todo en pacientes leucémicos. En el sexto caso, la paciente presentó recuperación medular al día 14 postquimioterapia con población anaplásica de promielocitos, requiriendo nuevo ciclo de quimioterapia. Esto resulta interesante porque sugiere que las alteraciones en las pruebas hemostáticas, excluyendo otras causas como sepsis, podrían servir de indicadores de enfermedad residual.

## V. CONCLUSIONES

Hemos visto que las LPA presentan desde el inicio tanto excesiva Generación de Trombina como Fibrinolisis anormal.

Comparándola con la CID, la coagulopatía de esta Leucemia tiene diferencias quizá sólo en la magnitud del fenómeno trombótico.

Nuestros resultados muestran una excesiva formación y lisis de trombos, ambos eventos acompañados por una severa Fibrinogenolisis. La gravedad, tiempo de presentación y caracterización por pruebas de laboratorio de estas alteraciones hemostáticas, varían a lo largo de la evolución de la enfermedad y de acuerdo al uso oportuno de quimioterapia y manejo hemostático.

Por sensibilidad, costo y disponibilidad, los ensayos que más utilidad mostraron fueron: Dímero D, Antiplasmina y Fibrinógeno. En el momento del diagnóstico, el D-D se encuentra muy elevado, la AP en actividad baja y hay niveles bajos de fibrinógeno.

Los productos líticos predominantes fueron los de Fibrina, pero no sólo los D-D sino también una cantidad notable no bien caracterizada de productos sin entrecruzamientos.

Esta actividad fibrinolítica atípica se relaciona con la población de promielocitos y sus proteasas, aunque queda por definir la presencia de receptores para u-PA en dichas células y el comportamiento del inhibidor correspondiente PAI-2

Como no se puede establecer una alteración única de la coagulación, no hay tratamiento bien definido. Sin embargo, con nuestro pacientes pudimos comprobar que son indispensables los antifibrinolíticos (mientras no se tengan ensayos clínicos suficientes con antiproteasas) y la transfusión de fibrinógeno.

No podemos asentar con certeza estadística que el uso del esquema propuesto con anticoagulación mixta (heparina y cumarínicos) es la forma ideal de tratamiento pues todavía falta llevar prospectivamente el análisis de más pacientes. Sin embargo, anotamos que los pacientes que recibieron este manejo acortaron el tiempo de la coagulopatía a un promedio de ocho días ( $P < 0.05$ ) y no requirieron plasma. Aun más, con cualquiera de los dos manejos utilizados en este protocolo, se ha logrado abatir la cifra de muertes tempranas por hemorragia en las LPA atendidas en el Departamento de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico La Raza.

2

"La imaginación es más importante que el conocimiento."

Albert Einstein

## APENDICES



## APENDICE 1

### TECNICA DE CLAUSS PARA MEDIR FIBRINOGENO.

Se utiliza Trombina bovina en alta concentración (comercialmente se dispone de 30 y 100 U Trombina/ml). Para este protocolo utilizamos una concentración de 30 U/ml, reconstituidas en agua destilada.

1) Se diluyo un plasma de referencia (concentración conocida de Fibrinógeno) con Buffer Veronal de Owren (pH=7.35) en serie, 1:5, 1:15: 1:40.

Se atemperaron a 37°C , 0.2 ml de cada una de las diluciones y cantidad equivoiométrica de Trombina.

2) En un Fibrómetro, se cronometró el tiempo de formación de coágulo al agregar a 0.2 ml de cada dilución, 0.2 ml de Trombina.

3) Con los resultados de trazó curva de referencia (concentración vs tiempo).

4) Para las muestra problemas se utilizó la dilución ideal para poder interpolar el tiempo que, con el mismo método anterior, tomara en formar coágulo al agregar Trombina. Generalmente nos bastó con dilución 1:10 con Buffer Veronal de Owren. Después de interpolar se corrigió el factor de dilución.

Clauss. A. Gernnungs Physiologische Schnell Methode sur Bestimmung des Fibrinogens. Acta Haematol 1957; 17:237-

## APENDICE 2

### ACTIVIDAD DE ALFA-2-ANTIPLASMINA.

Kit: Chromostrate alfa-2-antiplasmin (Organon Teknika B.V., Bostel, Holland).

-Determinación colorimétrica cuantitativa.

Utilizamos técnica de Punto final.

1) Preparamos diluciones 1:15 de las muestras de plasma problema, de controles y de plasmas de referencia (diluciones en serie) con el Buffer provisto en el kit.

2) Incubamos cada una de las diluciones a 37°C durante 5 minutos.

3) Se mezclaron 200  $\mu$ l de plasma con 200  $\mu$ l del reactivo de Plasmina (para formar complejos PAP), incubando 30 segundos a 37°C.

4) Agregamos 200  $\mu$ l de sustrato (amida) e incubamos a 37°C durante 90 seg. Sobre este sustrato actúa la plasmina libre produciendo color.

5) Se paro la reaccion con ác. acético al 50% (200  $\mu$ l).

6) Se leyó color contra un blanco (plasma, agua y ácido acético) a 405 nm. La lectura resulta ser inversamente proporcional a la concentración de antiplasmina.

7) De acuerdo a las lecturas de las diluciones del plasma de referencia se traza la curva patrón y sobre ella se interpolan los resultados de absorbancia para las muestras problema (actividad vs absorbancia).

## APENDICE J

### SEMICUANTIFICACION DE DIMERO D

Kit: Fibrinosticon (Organon Teknika B.V., Boxtel, Holland).

-Inmunoensayo de aglutinación con partículas de látex.

Se prepararon muestras de plasma sin diluir o en las diluciones necesarias de acuerdo a los resultados, siempre en Buffer Glicina (serie de preferencia 1:2, 1:4, etc.)

1) Sobre placa de lectura o portaobjeto limpio se colocaron por separado 20  $\mu$ l de cada muestra.

2) Se utilizaron además controles negativo y positivo

3) En cada una de las áreas con muestra se colocaron 30  $\mu$ l de la suspensión de partículas de látex recubiertas con anticuerpo monoclonal anti D-D.

4) Se hizo la mezcla en cada área y se mantuvo la placa en agitación suave durante 2 minutos.

Se observó la aglutinación y se calculó semicuantitativamente el D-D de acuerdo a:

Sin aglutinación en muestra sin diluir = <500 ng/ml  
(valor normal)

Con aglutinación: 500 x dilución (ng/ml)

## APENDICE 4

### ACTIVIDAD DE ANTITROMBINA.

Kit: Chromostrate Antithrombin III (Organon Teknika B.V., Boxtell, Holland)

-Determinación colorimétrica cuantitativa.

Utilizamos Técnica de punto final.

1) Diluimos 1:40 el plasma problema, el control y plasma de referencia (dilución seriada (40, 80, 160) con Buffer provisto por el kit.

2) Cada dilución se atemperó a 37°C durante 3 minutos.

3) Se mezclaron 200  $\mu$ l de la dilución con 200  $\mu$ l del reactivo de Trombina y se incubó 60 segundos a 37°C. La Trombina forma un complejo heparina:Trombina:Antitrombina del plasma.

4) Se agregaron 200  $\mu$ l de sustrato (amida) y se incubó 30 segundos. Sobre este sustrato actúa la Trombina libre restante y produce color.

5) Se frenó la reacción con ácido acético al 50% (200  $\mu$ l)

6) Se leyó color a 405 nm contra un blanco (plasma, agua y ácido acético). La lectura es inversamente proporcional a la concentración de ATIII. La curva de referencia se traza de acuerdo a los valores de las diluciones del plasma de referencia.

## APENDICE 5

### ELISA PARA FRAGMENTO 1+2 DE PROTROMBINA.

Kit: ELISA para Fragmento 1+2 (Experimental) (Organon  
Teknika B.V., Bostel, Holland)

Los pocillos tienen anticuerpo monoclonal anti-F1+2  
(fase solida).

1) En los pocillos se depositan 100  $\mu$ l de control, de  
calibradores del kit (valores de referencia) y de plasma  
problema, que previamente fueron diluidos 1:10 con un reactivo  
estabilizador provisto por el kit.

2) Se incuba 1 hora a temperatura ambiente.

3) Se lava cuatro veces con Buffer fosfato

4) Se agrega a cada pocillo 100  $\mu$ l de conjugado  
(policlonal anti-dominio N terminal de Protrombina, conjugado  
con peroxidasa) y se incuba 60 minutos a temperatura ambiente.

5) Se lava cuatro veces con Buffer

6) Se agrega sustrato (tetrametilbencidina), 100  $\mu$ l,  
incubándose 10 minutos. La reacción se para con ácido  
sulfúrico 2N

Se leyó absorbancia a 450 nm, usando los calibradores y  
controles para trazar la curva patron.

## APENDICE 6

### ELISA PARA ATM (COMPLEJOS ANTITROMBINA-PROTEASAS)

Kit: Asserachrom ATM (Diagnostica Stago, Asnières-Sur-Seine, France)

Experimental.

Los pocillos tienen anticuerpo monoclonal antitrombina III (fase sólida)

1) En cada pocillo se colocan 200  $\mu$ l de problemas, estándares y controles, diluidos cada uno 1:5 en Buffer del kit. Se incuba 1 hora a temperatura ambiente.

2) Se lava cinco veces con Buffer de lavado

3) Se agregan 200  $\mu$ l de inmunoconjugado (policlonal antiATIII conjugado a peroxidasa) y se incuba 1 hora a temperatura ambiente.

4) Se lavan cinco veces

5) Se agregan 200  $\mu$ l de sustratos (ortofenilendiamino, OPD) y se incuba 5 minutos. Se detiene la reacción con 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico 2N

6) Se lee absorbancia a 492 nm y se traza curva patrón de acuerdo a estándares.

## APENDICE 7

### ELISA PARA PAI-1.

Kit: TintElize PAI-1 (Biopool, Menarini Diagnosticos, Barcelona)

Los pocillos tienen anticuerpo monoclonal anti-PAI-1 liofilizado que se reconstituye con 100  $\mu$ l de Buffer Fosfato-EDTA-Tween 20.

1) Se agregan 20  $\mu$ l de muestra y controles en cada pocillo y se incuban 2 horas a temperatura ambiente. No se requiere lavado posterior.

2) Se agregan 50  $\mu$ l de inmunoconjugado y se incuba 1 hora.

3) Se hacen cuatro lavados con Buffer y se agrega el sustrato OPD para incubar 15 minutos. La reacción se para con 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico.

4) Se lee absorbancia a 492 nm, trazando curva de referencia con los controles.

## APENDICE 6

### ELISA PARA PFL.

Kit: Fibrinostika TDP (Organon Teknika B.V., Boxtel, Holland)

Se prepararon diluciones seriadas 1:3 con Buffer de fosfatos, de un calibrador que originalmente contiene 900 ng/ml de PFL.

Diluímos los plasmas-problema 20 veces en un Buffer de diluciones (dilución alta por esperarse en este caso valores elevados).

1) Agregamos (por duplicado) las diluciones del calibrador, muestras-problema y control negativo a los pocillos recubiertos con anticuerpo monoclonal antiPFFbn/PFFbg (fase sólida). Se incubaron durante 15 minutos a 37°C.

2) Se efectuaron cuatro lavados con Buffer de fosfatos.

3) Se agregó inmunoconjugado (antiPFFbn/PFFbg + peroxidasa) y se incubó durante 15 minutos a 37°C.

4) Se efectuaron nuevamente lavados con Buffer.

5) Se añadió a cada pocillo el sustrato (previamente preparado), solución de Tetrametilbencidina, 100  $\mu$ l, y se incubó durante 10 minutos a 37°C. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2N.

6) Se leyó absorbancia a 450 nm. Se gráfico en papel semilogarítmico la curva (absorbancia vs concentración), con ayuda del calibrador en sus diferentes diluciones.

7) La prueba se validaba si por lo menos se obtenía un



control negativo ( $< 0.250$  ng/ml) y si no se había eliminado más de una dilución de calibrado, por no dar lectura razonable.

8) Las lecturas de las muestras-problema se interpolaron en la curva de referencia. El valor que así se obtuvo, se multiplicó por el factor de dilución (20).

Obtuvimos valores para nuestra población, los cuales quedaron dentro del límite fijado por este kit,  $< 650$  ng/ml.

(Las muestras utilizadas siempre fueron conservadas en antifibrinolítico)

## APENDICE 9

ELISA PARA PFFbn.

Kit: Fibrinostika FbDP (Organon Teknika B.V., Boxtel, Holland)

Se siguió el mismo procedimiento que para los PFT. Aquí los pocillos estaban adsorbidos con anticuerpo monoclonal murino anti Fb/Fbg; pero el anticuerpo conjugado era sólo antiFbn.

Esta prueba detecta todos los productos de degradación de la Fibrina, tanto los Dímero D como los que no tienen entrecruzamientos.

Además, se verificó que la relación ponderal de PFFbg/PFFbn no fuera < cinco para no detectar valores exageradamente elevados.

Nuevamente medimos estos productos en una población sana y el resultado quedó dentro de los límites fijados por este kit. < 310 ng/ml.

(Se utilizaron muestras conservadas en antifibrinolítico)

## APENDICE 10

### ELISA PARA PFFbg

Kit: Fibrinostika FgDP (Organon Teknika B.V., Boxtel, Holland)

Se utilizó el mismo procedimiento que para PFT.

El anticuerpo monoclonal en fase sólida es antiFbn/Fbg, pero el monoclonal conjugado era anti-Fibrinopéptido A.

Esta prueba puede dar resultados inespecíficos, falsamente elevados, si la relación ponderal PFFbn/PFFbg  $> 7.5$

Los valores normales que establece el Kit son  $< 250$  ng/ml, con lo cual coincidió la medición en una población autóctona sana.

## APENDICE II

### ACTIVIDAD HEPARINICA ANTIXa.

Kit: Stachrom Heparin (Diagnostica Stago, Asnières-Sur-Seine, France)

- Método colorimétrico para heparinas de bajo peso molecular.

Se determino efecto a las 3 horas después de la aplicación.

Para construir curva de referencia, se preparó un plasma normal agregándole la misma cantidad de heparina que se utilizara en los pacientes.

1) Se mezclaron 100  $\mu$ l de plasma-problema con 100  $\mu$ l de ATIII y se diluyó con 800  $\mu$ l de Tris-EDTA (pH=8.4). La misma mezcla se utilizó para las muestras de curva de referencia.

2) El método colorimétrico se desarrolló en tubos de plástico a 37°C, en la siguiente secuencia:

Se incubaron durante 2 minutos, 200  $\mu$ l de muestra o plasma de referencia.

Se agregaron para mezclar, 200  $\mu$ l de factor Xa, incubando por 30 seg.

Se agregaron 200  $\mu$ l de sustrato cromogénico sobre el que actuaría el factor Xa libre (que no se hubiera acoplado a la heparina-ATIII en el paso anterior) y se incubó 30 segundos.

La reacción se paró con ácido acético al 50%.

Se leyó la absorbancia a 405 nm del color desarrollado contra un blanco equívolumétrico (ácido acético+factor Xa+plasma+cromógeno).

Se trazó curva de referencia (absorbancia vs. Heparina U/ml) con los plasmas preparados para ello. Utilizamos la conversión: 7500 U Chouay/día de "Fraxiparine"  $\approx$  0.1 antiXa IU/ml y 15 000 U Chouay/día  $\approx$  >0.1 - 0.2 antiXa IU/ml.

## BIBLIOGRAFIA

## BIBLIOGRAFIA

1. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. French-American-British (FAB) Cooperative Group. Proposals for the Classification of Acute Leukemias. *Br J Haematol* 1976; 33:451-8.
2. Hillestad LK. Acute Promyelocytic Leukemia. *Acta Med Scand* 1957; 159:189-94.
3. Feldman EJ, Arlin ZA, Ammedt T, et al. Acute Promyelocytic Leukemia: A 5 years experience with new antileukemic agent and a new approach to prevent fatal hemorrhage. *Acta Hematol (Basel)* 1989; 82(3):117-21.
4. Koeffler P. Syndromes of Acute Nonlymphocytic Leukemia. *Ann Intern Med* 1987; 107:448-58.
5. Jarque I, Sanz MA, Aragónés M, et al. Leucemia Promielocítica Aguda microgranular (M3 variante): Estudio de 14 pacientes. *Sangre* 1988; 33(4):291-5.
6. Ventura GV, Hester JP, Dixon DO, et al. Analysis of risk factors for fatal hemorrhage during induction therapy of patients with Acute Promyelocytic Leukemia. *Hematol Pathol* 1989; 3(1):23-9.
7. Groopman J, Ellman L. Acute Promyelocytic Leukemia. *Am J Hematol* 1979; 7:395.
8. Tan HR, Wages B, Galnick HR. Ultrastructural studies in Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood* 1972; 39:625.
9. Stone RM, McGuire M, Goldberg MA, et al. Complete Remission in Acute Promyelocytic Leukemia despite persistence of abnormal bone marrow promyelocytes during induction therapy: Experience in 34 patients. *Blood* 1988; 71:690.
10. Cunningham I, Gee TS, Reich LM, et al. Acute Promyelocytic Leukemia: Treatment results during a decade at Memorial Hospital. *Blood* 1989; 73:116.

11. Kantarjian HM, Keating MJ, Walters RS, et al. Acute Promyelocytic Leukemia: MD Anderson Hospital Experience. *Am J Med* 1986; 80:789.
12. Davey F, Davis RB, MacCallum JM, et al. Morphologic and Cytochemical characteristics of Acute Promyelocytic Leukemia. *Am J Hematol* 1989; 30:221-7.
13. Golombe HM, Rowley JD, Vordiman JW, et al. Microgranular Acute Promyelocytic Leukemia: a distinct clinical, ultrastructural and cytogenetic activity. *Blood* 1980; 55:253-9.
14. Stavem P. Differing form of variant form of hypergranular promyelocytic leukemia or transition between M3 and monocytic leukemia. *Scand J Haematol* 1981; 26:149-
15. Tomonaga M, Yoshida Y, Tagawa M, et al. Cytochemistry of Acute Promyelocytic Leukemia: leukemic promyelocytes exhibit heterogeneous patterns in cellular differentiation. *Blood* 1985; 66:350-7.
16. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Non-specific esterase of Acute Promyelocytic Leukemia. *Am J Hematol* 1988; 29:148-52.
17. Scott CS, Patel D, Drexler H, et al. Immunophenotypic and enzymatic studies do not support the concept of mixed monocytic/granulocytic differentiation in Acute Promyelocytic Leukemia: study of 44 cases. *Br J Haematol* 1989; 71:505-9
18. Gupta AD, Sapre RS, Shah AS, Aduani SH, Nair CN. Immunophenotypic heterogeneity in Acute Promyelocytic Leukemia. *Acta Haematol* 1989; 81:5-9.
19. De Rossi G, Avvisati G, Coluzzi S, et al. Immunological definition of Acute Promyelocytic Leukemia (FAB M3): a study of 39 cases. *Eur J Haematol* 1990; 45:168-71.
20. Breitman TR, Collins SJ, Keene BR. Terminal Differentiation of Human promyelocytic Leukemic cells in primary culture in response to Retinoic acid. *Blood* 1981; 57(6):1000-4.
21. Wyermans PW, Rebel V, Ossenkoppele GJ. Combined procoagulant activity and proteolytic activity of Acute Promyelocytic Leukemia cells: reversal of the bleeding disorder by cell differentiation. *Blood*



1989; 73(3):800-5.

22. Yeu A, Forbes M. c-myc Downregulation and precommitment in HL-60 cells due to bromodeoxyuridine. *Cancer Res* 1990; 50:1411-20.
23. Trewyn RW, Grever MR, Patrick DE, French BT. Queuine, a tRNA anticodon wobble base maintains the proliferative and pluripotent potential of HL-60 cells in the presence of the differentiating agent 6-thioguanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:370-
24. Cho Ching YS, Ciatt I, Pepe S, Yokozaki H, Tortora G. Differentiation of HL-60 leukemia cells by type I regulatory subunit antisense oligodeoxynucleotide of cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:2011-15.
25. Rowley JD, Golombe HM, Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in Acute Promyelocytic Leukemia. *Lancet* 1977; 1:549.
26. Longo L, Pandolfi PP, Biondi A, et al. Rearrangements and aberrant expression of the retinoic acid receptor alfa gene in Acute Promyelocytic Leukemia. *J Exp Med* 1990; 172:1571-5.
27. Chang KS, Lu J, Trujillo JM, et al. The t(15;17) breakpoint in Acute Promyelocytic Leukemia cluster within two different sites of the myl gene: targets for the detection of minimal residual disease by the polymerase chain reaction. *Blood* 1992; 79(3):554-8.
28. de Thé H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A. The t(15;17) translocation of Acute Promyelocytic Leukemia fuses the retinoic acid receptor alfa gene to a novel transcribed locus. *Nature* 1990; 347:558-
29. Biondi A, Rambaldi A, Alcalay M, et al. RAR-alfa gene rearrangements as a genetic marker for diagnosis and monitoring in Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood* 1991; 77(7):1418-22.
30. Pelicci PP, Alcalay M, Zangrilli D, et al. Translocation breakpoint of APL lies within two retinoic acid receptor alfa locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:1977-81.

31. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240:889.
32. Warrell B, Raymond P. Novel Retinoic Acid receptor alpha transcripts in Acute Promyelocytic Leukemia responsive to all-trans-Retinoic Acid. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82(24):1932-3.
33. Lo Coco F, Avvisati G, Diverio D, et al. Molecular evaluation of response to all-trans-Retinoic Acid therapy in patients with Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood* 1991; 77(8):1657-9.
34. Jorgenson KF, Antoun GR, Zipf TF. Chromatin Structural Analysis of the 5' end and Contiguous Flanking Region of the Myeloperoxidase Gene. *Blood* 1991; 77(1):159-64.
35. Al-Mondhury H. Tumor interaction with hemostasis: the rationale for the use of platelet inhibitor and anticoagulants in the treatment of cancer. *Am J Hematol* 1984; 16:193-202.
36. Rocha F. Clotting activation and impairment of fibrinolysis in malignancy. *Thromb Res* 1989; 54:699-
37. Cozzolino F, Torcia M, Milian, et al. Potential role of Interleukin-1 as the trigger for diffuse intravascular coagulation in Acute Non-Lymphocytic Leukemia. *Am J Med* 1988; 84:240.
38. Voss R, et al. Activation and inhibition of fibrinolysis in septic patients in an intensive care unit. *Br J Haematol* 1990; 75:99-105.
39. Speiser W, Bowen S, Anders E, et al. Hemostatic and fibrinolytic parameters in patients with acute myeloid leukemia: activation of blood coagulation, fibrinolysis and unspecific proteolysis. *Blut* 1990; 61:298-302.
40. Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. *Thromb Haem* 1980; 43:77-89.
41. Collen D, Wyman B. Turnover of antiplasmin, the fast acting inhibitor of plasma. *Blood* 1979; 53:313-24.
42. Amiral J, Vissac AM, Mimilia F, Grosley B. Assay of blood

activation by measurement of ATIII serine-esterases complexes (ATM) using a specific monoclonal antibody 4C9. *Thromb Haemost* 1989; 62:479.

43. Booth NA, Bennett JM. Plasmin-alfa2antiplasmin complexes in bleeding disorders characterized by primary or secondary fibrinolysis. *Br J Haematol* 1984; 56:545-
44. Sultan C, Heilmann Gouault M, Tulliez M. Relationship between blast cell morphology and occurrence of a syndrome of disseminated intravascular coagulation. *Br J Haematol* 1973; 24:255-9.
45. Gralnick HR, Abrell E. Studies of the procoagulant and fibrinolytic activity of promyelocytes in Acute Promyelocytic Leukemia. *Br J Haematol* 1973; 24:89-
46. Sakuragawa N, Takahashi K, Hoshiyama M, et al. Pathologic cells as procoagulant substance of disseminated intravascular coagulation syndrome in Acute Promyelocytic Leukemia. *Thromb Res* 1976; 8:263-73.
47. Wada H, Naguno T, Tomeoku M, et al. Coagulant and fibrinolytic activities in the leukemic cell lysates. *Thromb Res* 1982; 30:315-22.
48. Falanga A, Alessio MG, Donati MB, Barbui T. A new procoagulant in acute leukemia. *Blood* 1988; 71:870.
49. Andoh K, Kubota T, Takada M, et al. Tissue factor activity in leukemic cells. *Cancer* 1987; 59:748-54.
50. Bauer K, Rosenberg R. Thrombin generation in Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood* 1984; 64:791-6.
51. Rosenberg R, Teitel JM, Bauer KA, Lau HK. Studies of the Prothrombin activation pathway utilizing radioimmunoassays for the F2/F1+2 fragment and Thrombin-Antithrombin complex. *Blood* 1982; 59:1086-
52. Bosclair MD, et al. A comparative evaluation of assays for markers of activated coagulation and/or fibrinolysis thrombin-antithrombin complex, D-Dimer and Fibrinogen/Fibrin fragment E antigen. *Br J Haematol* 1990; 74:471-9.
53. Rodeghiero F, Mannucci PM, Vigano S, et al. Liver dysfunction rather than intravascular coagulation as the main cause of low Protein C and antithrombin in

Acute Leukemia. Blood 1984; 63:965.

54. Sakata T. The specific activity of plasminogen activator inhibitor 1 in disseminated intravascular coagulation with acute promyelocytic leukemia. Blood 1991; 77:1949-57.
55. Asakura H, et al. Changes in plasmas levels of tissue plasminogen activator/inhibitor complex and active plasminogen activator inhibitor in patients with disseminated intravascular coagulation. Am J Hematol 1991; 36:176-83.
56. Bennett B, Booth N, Croll A, Dawson AA. The bleeding disorder in acute promyelocytic leukaemia: fibrinolysis due to u-PA rather than defibrination. Br J Haematol 1989; 71:511-7.
57. Hamaguchi M, Morishita Y, Takahashi I, et al. FDP D-Dimer induces the secretion of Interleukin-1, urokinase-type plasminogen activator, and plasminogen activator inhibitor-2 in a human promonocytic leukemia cell line. Blood 1991; 77:94-100.
58. Collen D. International Committee Communications: Report of the meeting of the subcommittee on fibrinolysis. Thromb Haemost 1986; 56:415-6.
59. Kruihof EK, et al. Plasminogen activator inhibitor 1 and PAI-2 in various disease state. Thromb Haemost 1988; 59:7-12.
60. Williams E. Plasma alfa-2-antiplasmin activity. Role in the evaluation and management of fibrinolytic states and other bleeding disorders. Arch Intern Med 1989; 149:1769-72.
61. Okajima K, et al. Characterization of the fibrinolytic state by measuring stable cross-linked fibrin degradation products in disseminated intravascular coagulation associated with acute promyelocytic leukemia. Acta Haematol 1989; 81:15-18.
62. Kahlé LH, Avvisati G, Lamping RJ, et al. Isolated acquired alfa-2-antiplasmin deficiency in acute promyelocytic leukemia. Thromb Haemost 1983; 50:233.
63. Avvisati G, Ten Cate JW, Sturk A, Lamping R, Petti MC, Mandelli F. Acquired alfa-2-antiplasmin deficiency

- in acute promyelocytic leukemia. *Br J Haematol* 1988; 70:43-8.
64. Kahlé LH, Avvisati G, Lamping RJ, et al. Turnover of alpha-2-antiplasmin in patients with acute promyelocytic leukemia. *Scand J Clin Lab Invest* 1985; 45(suppl 178):75-80.
65. Takahashi H, Tatewaki W, Wada K, et al. Plasmin-alpha2antiplasmin complex in plasma of patients with DIC. *Am J Hematol* 1988; 28:162-6.
66. Takahashi H, Tatewaki W, Wada K, Hamano M, Shibata A. Thrombin vs Plasmin generation in DIC associated with various underlying disorder. *Am J Hematol* 1990; 33:90-5.
67. Bennett B, Ogston D. Fibrinolytic bleeding syndromes. En: Ratnoff OD, Forbes CD, eds. *Disorders of Hemostasis*. Philadelphia, WB Saunders Company 1991; pp. 329-31.
68. Sanz M, Jarque I, Martin G, et al. Acute Promyelocytic Leukemia. Therapy results and prognostic factors. *Cancer* 1988; 61:7-13.
69. Cordonnier C, Vernant JP, Brun B, et al. Acute Promyelocytic Leukemia in 57 previously untreated patients. *Cancer* 1985; 55:18.
70. Keane T, Gorman AM, O'Connell AG, Fennelly JJ. Epsilon-aminocaproic acid in the management of acute promyelocytic leukemia. *Acta Hematol* 1976; 56:202-4.
71. Hoyle CF, Swirsky DM, Freedman L, Hayhoe GJ. Beneficial effect of Heparin in the management of patients with acute promyelocytic leukemia. *Br J Haematol* 1985; 68:283-9.
72. Takahashi H, Takizawa S, Tatewaki W, et al. Nafamostat mesilate (FUT-175) in the treatment of patients with DIC. *Thromb Haemost* 1989; 62:372.
73. Takemoto Y, Tanaka S, Tanabe J, et al. Studies on the effects of primary therapy for DIC following circulatory arrest. *Am J Hematol* 1986; 21:377.
74. Umeki S, Adachi M, Watanabe M, Yaji S, Soejima R. Gabexate as a therapy for DIC. *Arch Intern Med* 1988; 148:1409.

75. Swartz B, Williams EC, Conlan MG, Mosher DF. Epsilon-aminocaproic acid in the treatment of patients with acute promyelocytic leukemia and acquired alfa-2 antiplasmin inhibitor deficiency. *Ann Intern Med* 1986; 105:873-7.
76. Rodeghiero F, Avvisati G, Castaman G, Barbui T, Mandelli F. Early deaths and antihaemorrhagic treatments in acute promyelocytic leukemia: a GIMEMA retrospective study in 268 consecutive patients. *Blood* 1990; 75:2112.
77. Avvisati G, Büller HR, Ten Cate JW, Mandelli F. Tranexamic acid for control of haemorrhage in Acute Promyelocytic Leukemia. *Lancet* 1989; 2:122-4.
78. Tallman MS, Kwann HC. Reassessing the hemostatic disorder associated with Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood* 1992; 79(3):543-53.
79. Chen ZX, Xue YQ, Zhang R, et al. A clinical and experimental study on all-trans retinoic acid-treated acute promyelocytic leukemia patients. *Blood* 1991; 78:1413-9.
80. Chomienne C, Castaigne S, Daniel MT, et al. All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results. *Blood* 1990; 76:1704.
81. Chomienne C, et al. All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. II. In vitro studies: Structure-function relationship. *Blood* 1990; 76:1710.
82. Amesóné K. Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature* 1988; 336:262.
83. González Ll J. Las características de la coagulopatía de la Leucemia Promielocítica Aguda. *Sangre* 1991; 36:56.
84. Rodeghiero F. Modifications of hemostatic parameters induced by "supra-normal" antithrombin III levels in Acute Promyelocytic Leukemia. En: Abstracts of the XIIIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Amsterdam, Holanda;

1991.

85. Lindhout T. The anticoagulant mode of action of heparins.  
En: Abstracts of the XIIIth Congress of the  
International Society on Thrombosis and Haemostasis.  
Amsterdam, Holanda, 1991.
86. Barrowcliffe .TW, Curtis AD, Johnson EA, Thomas DP. An  
international standard for low molecular weight  
heparin. Thromb Haemost 1988; 60(1):1-7.