



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Evaluación de la respuesta eritropoyética en
pacientes con eritroblastopenia congénita (Anemia
de Blackfan-Diamond) tras suplementación dietética
con L-Leucina

Evaluation of the erythropoietic response in patients
with congenital erythroblastopenia (Blackfan -
Diamond anemia) after dietary supplementation
with L - Leucine

Autor/es

Nerea Quílez Trasobares

Director/es

Maria del Valle Recasens Flores

Co-Director/es

Eduardo Bustamante Rodríguez
Alejandro Sanz París

Facultad de Medicina
Año 2015- 2016

Repositorio de la Universidad de Zaragoza – Zaguan
<http://zaguan.unizar.es>

1. Abstract.....	página 1
2. Palabras Clave.....	página 2
3. Introducción	
3.1 Definición y alteraciones analíticas de la enfermedad; Anemia de Blackfan-Diamond o Eritroblastopenia congénita.....	página 2
3.2 Prevalencia e Incidencia.....	página 2
3.3 Clínica	página 2,3
3.4 Diagnóstico diferencial.....	página 3
3.5 Genética y Herencia.....	página 3,4
3.6 Bases fisiopatológicas y genéticas de la Anemia de Blackfan-Diamond.	página 4-6
3.7 Disfunción ribosoma y el desarrollo de glóbulos rojos.....	página 6,7
3.8 Tratamientos disponibles en la anemia de Blackfan-Diamond	
3.8.1 Glucocorticoides.....	página 7,8
3.8.2 Efectos secundarios del tratamiento con corticoides crónicos.....	página 8
3.9 L-Leucina: objetivo terapéutico.	
3.9.1 Qué es la L-Leucina.	página 8
3.9.2 Papel de la L-Leucina en la Anemia de Blackfan-Diamond.....	página 8,9
3.9.3 Resultados del tratamiento con L-Leucina en estudios experimentales.	página 9- 11
4. Objetivos	
4.1 Principal.....	página 11
4.2 Secundarios.....	página 11
5. Material y métodos	
5.1 Criterios de eficacia de L-Leucina.....	página 12
5.2 Criterios de cumplimentación del tratamiento.....	página 12
6. Resultados	
6.1 Descriptivo general pacientes.....	página 13
6.2 Descriptivo genética pacientes.....	página 13-16
6.3 Descriptivo sobrecarga de hierro.....	página 16

6.4 Descriptivo parámetros analíticos de los pacientes	
6.4.1 Serie roja: Hematimetría.....	página 17-19
6.4.2 Recuento reticulocitario.....	página 20,21
6.4.3 Metabolismo del hierro.....	página 21,22
6.5 Descriptivo aminoacidograma	página 23
6.6 Descriptivo calidad de vida	página 24
6.7 Criterios de remisión.....	página 24
7. Discusión	
7.1 Limitaciones del estudio:	página 25
7.2 Discusión del estudio	
7.2.1Generales.....	página 25,26
7.2.2 Metabolismo del hierro.....	página 26
7.2.3 Contaje reticulocitario.....	página 27
7.2.4 Hematimetría, EPO, eADA y genética en relación a cada paciente.....	página 27-30
8. Conclusiones.	página 31
9. Bibliografía.....	página 32-34
10. Anexo I.....	página 35-37

1. Abstract

Introducción y objetivos: La anemia de Blackfan-Diamond (ABD), o eritroblastopenia congénita arregenerativa, se caracteriza por fallo eritrocitario, anomalías congénitas y predisposición a neoplasias. De extremadamente baja prevalencia. Se pretende evaluar la respuesta eritropoyética al tratamiento con L-Leucina en los pacientes con anemia de Blackfan-Diamond como nueva diana terapéutica.

Material y métodos Se ha realizado un estudio observacional, descriptivo y analítico sobre los pacientes de una consulta de eritropatología en un hospital terciario, referencia en una comunidad autónoma, a los que se les ha introducido una variación en su aporte nutricional. Recientemente, en dicha consulta se adicionó a la dieta L-Leucina, dirigido a un receptor clave (vía de la mTOR) en la patogénesis de la ABD. Se recogieron los datos de 7 pacientes antes de en el momento del primer registro, a los 3 y 5 meses. También se recopilaron los datos anteriores al inicio del suplemento.

Resultados: Edad media 25.8 (IC 95% 11.22-40.49). Se describe el perfil genético demostrando herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta y expresión variable y mutaciones de novo. Se describen las mutaciones. No se encontraron diferencias significativas en las distribuciones de hematimetría, volumen corpuscular medio, metabolismo del hierro. Sí en la evolución de la eADA y la EPO. Se describe el aminoacidograma, la calidad de vida según índice de Morisky-green y los casos de remisión completa.

Conclusiones: En el seguimiento a 5 meses, apenas ha habido repercusión en la evolución de los pacientes en cuanto a sus parámetros. Tan sólo en la EPO y el ADA demostraron unas diferencias llamativas, algo que hace pensar que con un seguimiento más prolongado puedan verse reflejados los efectos del suplemento nutricional en esta enfermedad, que por su escasa prevalencia hace difícil la reunión de un tamaño muestral mayor.

Introduction and objectives: Diamond-Blackfan anemia (ABD), or congenital erythroblastopenia aregenerative is characterized by red cell failure, congenital abnormalities and predisposition to cancer. Extremely low prevalence. The purpose is to evaluate the erythropoietic response to treatment with L-Leucine in patients with Diamond-Blackfan anemia as a new therapeutic target.

Material and Methods: An observational, descriptive and analytical study on patients in a Erythropathology consult in a tertiary hospital, which is a reference in an autonomous community, which has introduced them to a variation in their nutritional intake. Recently in the consult ,L-Leucine as added to the diet, wich was directed to a key receptor (mTOR pathway) in the pathogenesis of ABD . The data were collected in 7 patients at the time the first record, at 3 and 5

months. In addition, the previous data of these patients, before the introduction of L-Leucine in the diet, was collected.

Results: Average age 25.8 (95% CI 11.22-40.49). The genetic profile is described showing autosomal dominant inheritance with incomplete penetrance and variable expression and it can be found *de novo mutations* also. The mutations have been described. No significant differences in the distributions of blood count, mean corpuscular volume, iron metabolism were found. On the other hand, in the evolution of the ADA and the EPO significant differences have been found. The aminoacidogram has been described, according to the quality of life index Morisky green and cases of complete remission.

Conclusions: In the follow-up to 5 months, there has been found a little impact on patient outcomes in their parameters. Only in the EPO and the ADA they showed some striking differences, which suggests that with longer follow-up may be reflected the effects of nutritional supplement in this disease, which by its low prevalence difficult meeting a larger sample size.

2. Palabras Clave

Anemia de Blackfan-Diamond, Leucina, eritroblastopenia, enzima Adenosina-D-Aminasa, Eritropoyetina

3. Introducción

3.1 Definición y alteraciones analíticas de la enfermedad; Anemia de Blackfan-Diamond o Eritroblastopenia congénita

La anemia de Blackfan-Diamond (ABD) es una anemia congénita arregenerativa y con frecuencia macrocítica con eritroblastopenia, una médula ósea normocelular con ausencia de los precursores eritroides. Presenta además macrocitosis, elevación de la hemoglobina Fetal (HbF), y de la enzima Adenosina-D-Aminasa (eADA). La presencia de macrocitosis y HbF, se ha relacionado como consecuencia de un “estrés en la eritropoiesis” y omisión en las divisiones de los eritrocitos, aunque no es un mecanismo único en la patogenia de la ABD.

3.2 Prevalencia e Incidencia

La incidencia anual en la población general europea se estima alrededor de 1/150.000. Ambos sexos están afectados por igual y no se ha identificado ninguna predisposición étnica¹

3.3 Clínica

Los pacientes con Anemia de Blackfan-Diamond, presentan (la forma clásica) típicamente a las nueve semanas del nacimiento con astenia generalizada, dificultad para las tomas y lactancia, y

palidez mucocutánea. La mitad de todos los pacientes de ABD presentan baja estatura y anomalías somáticas congénitas. La más frecuente la craneofacial, (secuencia de Pierre- Robin: retrognatia, glosoptosis y fisura velopalatina media) y fisura palatal, anomalías urogenitales y de los pulgares. Además los pacientes con ABD tienen un riesgo elevado de padecer leucemia y cáncer.¹

3.4 Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial puede incluir eritroblastopenia transitoria, infección por parvovirus B19 y otras anemias congénitas. En casos familiares, el riesgo de recurrencia es del 50%. Las dos principales herramientas terapéuticas son transfusiones periódicas y corticosteroides de forma continua. Se puede considerar el trasplante alogénico de médula ósea en pacientes corticoresistentes con hermano no afecto y HLA idéntico. El pronóstico es generalmente bueno.¹

3.5 Genética y Herencia

La ABD es una enfermedad genética de herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta de expresión variable, aunque también puede presentarse como una mutación de novo. El análisis llevado a cabo por *Jeffrey M et al*² sobre el registro americano de pacientes con ABD demuestra que las alteraciones genotípicas, con o sin anomalías congénitas, aparecen en un número mucho mayor de casos hereditarios autosómico dominantes, del que se creía.

En el análisis genético a familiares de sujetos afectados, la incidencia de la herencia familiar se incrementa de un 10-15% que se creía, a un 45%. Por tanto, se considera que hay pacientes que sin cumplir los criterios tradicionales de ABD presentarían un cuadro de Blackfan-Diamond “no clásico”.³ Por ello, el diagnóstico de ABD podría no ser adecuado, por ejemplo, en pacientes con una anemia leve, o sin anemia con solo macrocitosis, o incluso en edad adulta⁴, y pacientes con estatura corta sin anormalidades en la eritropoyesis, que sin embargo sí presentarían las mutaciones descritas en la ABD³.

Actualmente, se han identificado unas mutaciones causantes de la enfermedad en un 40-45% de los pacientes. Todas ellas implican genes que codifican proteínas ribosómicas, bien de la subunidad pequeña del ribosoma (*RPS7*, *RPS17*, *RPS19*, *RPS24*), o de la grande (*RPL5*, *RPL11*, *RPL35A*). Las mutaciones en *RPS19*, *RPL5* y *RPL11* se encuentran en el 25%, 9% y 6,5% de los pacientes respectivamente, mientras que los otros genes están cada uno implicados en sólo un 1-3 % de los casos. La única correlación clara genotipo/fenotipo hecha hasta ahora es la asociación de anomalías craneocefálicas en portadores de las mutaciones *RPL5* y *RPL11*, y la baja prevalencia de esas anomalías en portadores de mutaciones en *RPS19*.

En un niño con anemia y eritroblastopenia, el diagnóstico puede ser confirmado por una historia familiar (10-20% de los casos), malformaciones asociadas (40% de los casos), y niveles elevados de adenosina-D-aminasa (ADA) de los eritrocitos, la cual es un marcador sensible pero no

específico que puede estar incluso elevado en familiares sin otro síntoma de ABD. La detección de la mutación causante de la enfermedad es de valor diagnóstico.

3.6 Bases fisiopatológicas y genéticas de la Anemia de Blackfan-Diamond.

Las bases fisiopatológicas de la ABD, son las mutaciones de las proteínas ribosomales, creando una disregulación en la biogénesis de los ribosomas. Se han ido identificando vías fisiopatológicas y en concreto efectos específicos sobre los tejidos que tienen estas mutaciones; en particular la deficiencia de la proteína ribosomal Rps19.

El ribosoma maduro es un complejo macromolecular dependiente de una disponibilidad bien equilibrada entre el RNA y las proteínas ribosomales, en el que cualquier mutación en las mismas que provoque una haploinsuficiencia es la causante de este desequilibrio y de la sintomatología en los pacientes de ABD. Esta vulnerabilidad se evidencia en los tejidos que requieren una alta eficiencia en la traducción del ADN, como es el caso de la principal alteración en este síndrome, la eritropoiesis ineficaz.

Con el fin de demostrar la base genética de este síndrome, se crearon estudios experimentales, los cuales recientemente, demostraron la existencia de una mutación en el gen RPS19, el primero descrito y que aparece aproximadamente en el 25% de los casos de ABD.

El primer ratón experimental fue homocigoto para la haploinsuficiencia del RPS19, la cual fue letal. El ratón heterocigoto mostró un fenotipo típico de la ABD. Sin embargo, estos ratones, debido a que la haploinsuficiencia había sido provocada, y con ello su anemia, no respondieron a la terapia esteroidea, y presentaron mutaciones en el c-kit y c-kit ligando, los cuales ahora se conocen que están involucrados en el mecanismo molecular en la patología de la ABD.⁵

*Uechi et al*⁶ extendieron estas observaciones para otras proteínas ribosomales, demostrando un defecto en la eritropoiesis en tres de 20 ratones con mutación en RPL35a, ya descrita en pacientes con ABD⁷. Se acepta que la ABD aparece como respuesta a un defecto celular intrínseco en el cual los progenitores eritroides son altamente sensibles a la apoptosis. Los fenotipos en ratones y peces cebra, sugieren que la regulación de la vía del oncogen p53 y juega un papel importante en el fenotipo pro-apoptoico de las células con haploinsuficiencia proteínica ribosómica.

La “hipótesis del estrés ribosomal”, descrita por *Dianzani y Loreni*⁸, explica que un decaimiento de la síntesis de las proteínas ribosomales activa la vía del p53, obteniendo como resultado un “stop” en el ciclo celular o apoptosis de estas células. Esto se traduce en el fenotipo de los pacientes con ABD: anemia, retraso en el crecimiento y malformaciones congénitas.

Además, la relación entre el nucléolo y el déficit de la síntesis de proteínas ribosomales no solo provoca apoptosis mediante p53, sino que también sugiere un papel de oncogénesis presente en la ABD⁹.

Hay muchos mecanismos que podrían explicar esta patogénesis, uno de los principales en la fisiopatología de la ABD, implica la interacción de determinadas proteínas ribosomales con la **MDM2 (Murine Double Minute)**, un potente regulador de los niveles y actividad del p53. La MDM2 es una ubiquitin-ligasa de estructura anular que interacciona y promueve la degradación del p53. Tres proteínas de la subunidad 60s (RPL5/RPL11/RPL23) se ha demostrado que se unen a la MDM2 reduciendo su actividad de ligasa, lo que se traduce en una estabilización del p53¹⁰. La interacción de estas proteínas con MDM2 se ha estudiado más frecuentemente en el contexto de fármacos que inhiben la transcripción de la ARN polimerasa I o tienen un efecto general sobre el montaje de ambas subunidades ribosomales, 40S y 60S.

En estos tratamientos, el ensamblaje ribosomal se inhibe en etapas tempranas de un proceso jerárquico y complejo mediante el cual las proteínas se unen directamente a rRNA para facilitar la posterior unión de otras proteínas ribosomales.

La interrupción en la unión de las subunidades ribosómicas resulta en la desviación de las proteínas ribosomales (las que deberían formar las subunidades del ribosoma) a otros destinos dentro de las células. En muchos casos se cree que las proteínas ribosómicas libres son degradadas rápidamente para evitar la presunta toxicidad asociada con la alta liberación de pequeñas proteínas básicas en la célula¹¹. En los últimos años, sin embargo, ha quedado claro que las proteínas ribosomales desviadas de sus destinos, pueden ser importantes moléculas de señalización que relacionan el conjunto del ribosoma fallido con la estabilización y activación de p53.

En contraste con los estudios de fármacos que inhiben el ensamblaje de las subunidades ribosomales, una deficiencia de la proteína ribosomal afecta principalmente sólo a su subunidad ribosomal correspondiente¹². Sólo la proteína ribosomal RPS7 (de la subunidad 40S) ha demostrado que interacciona con la MDM2, y esta interacción es más débil que la observada en la subunidad ribosomal grande con las proteínas antes mencionadas. Además, curiosamente, dos genes recientemente descritos como genes de la ABD, RPL5 y RPL11¹³, codifican respectivamente a las proteínas ribosomales Rpl5 y Rps11. Estas proteínas se unen enérgicamente a la MDM2,

posiblemente como un complejo junto con la subunidad 5s del rRNA¹⁴. El descubrimiento de las proteínas Rpl5 y Rps11, sugiere que la señal en esta vía permite operar aunque no sea al máximo de eficiencia, eludiendo el fenotipo pro-apoptico.

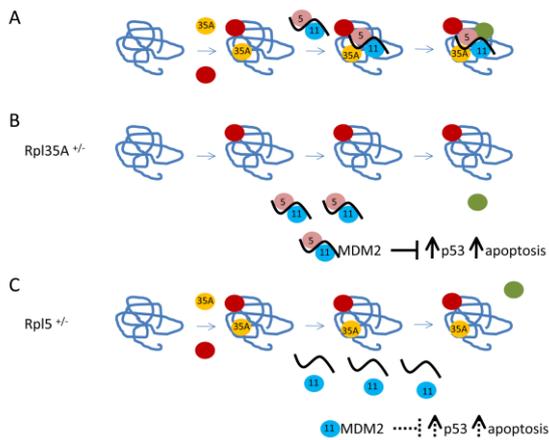


Figura 1. Hipótesis del modelo de ensamblaje de las proteínas ribosomales y la inducción de apoptosis en la ABD²: (A) Unión en sujetos sanos. (B) Unión no funcional en sujetos con deficiencia de la proteína 35A en la subunidad grande, la cual no permite la unión de las proteínas RPL5 y RL11 unidas al ARN reducen la actividad de la MDM2, estabilizando al p53 y promoviendo la apoptosis. (C) La haploinsuficiencia en el RPL5 no provocaría una fuerte interacción con la MDM2, ya que la proteína 11 no se uniría a ella sola, por lo que no se provocaría una fuerte apoptosis, pero tampoco transducción del ARN ribosomal.

Finalmente, *Pospisilova et al*¹⁵, pusieron de manifiesto las alteraciones bioquímicas cuantificables que servirían posteriormente para apoyar el diagnóstico de ABD, y monitorizar la evolución de la enfermedad, o simplemente se veían alteradas sin encontrar una relación fisiopatológica clara.

Se ha esclarecido como, al tratarse de una eritroblastopenia congénita arregenerativa conformando una aplasia pura de la serie roja, la médula ósea estimula una eritropoyesis ineficaz, elevando la eritropoyetina hasta niveles 1000-1500 veces por encima de lo normal. Así mismo, se puso de manifiesto una elevación de la enzima ADA, la cual viene siendo observada desde el diagnóstico de la enfermedad sin poder encontrar una explicación fisiopatológica que clarifique el mecanismo por el cual aparece elevada. Presenta además macrocitosis, elevación de hemoglobina fetal, y un conteo reticulocitario bajo, junto con una fracción reticulocitaria mínima desviada a la izquierda con una elevada fracción de reticulocitos inmaduros, apoyando la base fisiopatológica observada en la ABD.

3.7 Disfunción del ribosoma y el desarrollo de glóbulos rojos

Desde el diagnóstico de la enfermedad, se ha descrito la hipoplasia de células rojas selectiva como la característica definitoria de ABD, que parece estar en desacuerdo con el hecho de que los ribosomas son una característica ubicua de todas las células con la excepción de los eritrocitos maduros. Por otra parte, en raras ocasiones se observan también otras citopenias hematológicas significativas.

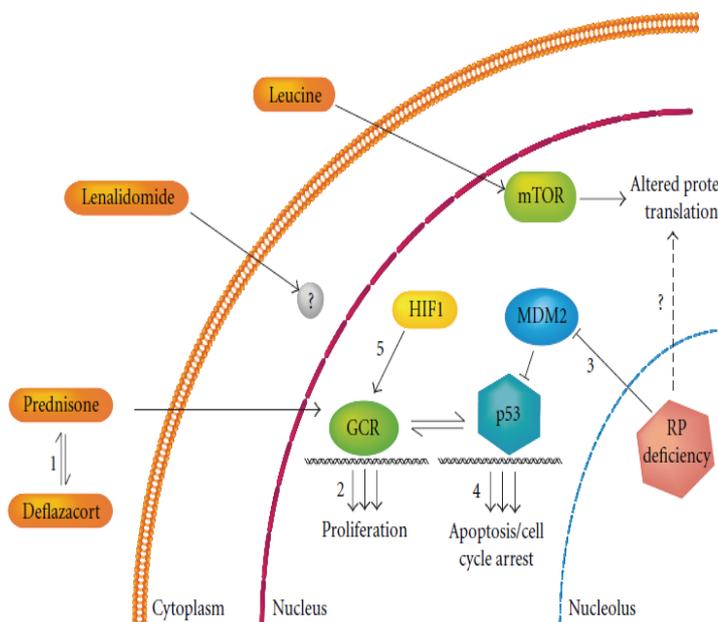
Se ha debatido cómo hace la haploinsuficiencia RPS19, RPS24, RPS17 y RPL35a, RPL5 y Rpl11 para manifestarse clínicamente al afectar sólo ciertos tejidos y células sobretudo en la producción de la serie roja.

La alta demanda para la síntesis de ribosomas asociados con la proliferación y diferenciación de precursores de células rojas pueden hacer a estos precursores inusualmente sensibles a los efectos de una reducción en la síntesis de ribosoma. La producción de glóbulos rojos de rápido crecimiento de los fetos se produce en el tercer trimestre de forma que es aproximadamente 3-5 veces mayor que en el adulto.

La edad media de presentación en el 93% de los pacientes que debutan durante el primer año de vida de la ABD clásica es de ocho semanas. Tras el nacimiento, la producción de eritropoyetina desciende en respuesta a elevadas presiones parciales de oxígeno, una hemoglobina elevada, y un cambio a la hemoglobina adulta (la cual tiene menos afinidad por el oxígeno que la fetal). La imposibilidad de llegar a un nuevo estado de equilibrio daría lugar a una presentación de ABD anémica a las 8 semanas, el momento en que se requiere de una nueva producción de glóbulos rojos. Estos cambios conducen a una anemia fisiológica transitoria. Tras el restablecimiento de una unidad eritroide y su estabilización en la síntesis de ribosomas, la presencia de la haploinsuficiencia para las proteínas ribosomales críticas (Rps19, Rpl5, etc), se manifiesta en la forma clásica de anemia arregenerativa.¹⁶

3.8 Tratamientos disponibles en la anemia de Blackfan-Diamond.

Figura 2. Vías involucradas en la patogénesis de DBA y posibles dianas para nuevos fármacos¹⁷. (1) La sustitución de la prednisona con un receptor de GC agonista con potencialmente menos efectos secundarios, por ejemplo, el deflazacort. (2) Identificación de genes implicados en la respuesta terapéutica a prednisona y la posterior identificación de compuestos que inducen o activan específicamente estos genes. (3) La identificación de los genes y vías implicadas en el mecanismo por el cual el estrés ribosomal induce una respuesta de p53. (4) Identificación de genes que actúan tras la activación de la vía p53 para inducir el fenotipo de ABD. (5) mejorar el efecto de GC en combinación con otros compuesto, por ejemplo, estabilizadores de HIF1 α .



3.8.1 Glucocorticoides

El mecanismo subyacente al efecto terapéutico de los glucocorticoides¹⁷ todavía no se comprende totalmente, y sigue siendo difícil averiguar si el efecto es específico de la enfermedad o simplemente el resultado de un estimulante directo sobre la auto-renovación de las células

precursoras eritroides¹⁸. Este último está soportado por el papel fisiológico del cortisol endógeno en la promoción de la auto-renovación de precursores eritroides y rápida normalización de la anemia grave¹⁹. La respuesta inducida por los glucocorticoides para la eritropoyesis tras la estimulación de la p53 se acelera en los ratones knock-out²⁰, lo que sugiere un papel recíproco del receptor glucocorticoideo y la p53 en la regulación de la eritropoyesis, el mantenimiento del equilibrio entre la auto-renovación y diferenciación.

3.8.2 Efectos secundarios del tratamiento con corticoides crónicos.

- Síndrome metabólico creando morfología tipo Cushing con obesidad, hipertensión arterial, diabetes tipo 2, osteoporosis, lipodistrofia, cara de luna llena, hiperpigmentación cutánea.

- Estreñimiento.

- Síntomas psíquicos debidos al aumento de los corticoides circulantes, como insomnio, irritabilidad, alteraciones en el comportamiento.

- Miastenia y debilidad muscular generalizada.

- *Retraso en el crecimiento y talla baja*, por lo que están especialmente limitados y a dosis mínimas en los niños (población diana debido a que es fundamentalmente en la edad en la que se encuentra esta patología, al año del nacimiento).

- Inmunosupresión permanente, lo cual provoca un amplio espectro de aumento de infecciones oportunista y aumento en la frecuencia y duración de procesos infecciosos, siendo típica la candidiasis oral

3.9 L-Leucina: objetivo terapéutico.

3.9.1 Qué es la L-Leucina.

La leucina es uno de los veinte aminoácidos que utilizan las células para sintetizar proteínas. Está codificada en el ARN mensajero como UUA, UUG, CUU, CUC, CUA o CUG. Su cadena lateral es no polar, un grupo isobutilo (2-metilpropilo). Es uno de los aminoácidos esenciales. La leucina se usa en el hígado, tejido adiposo, y tejido muscular. Se ha descrito la presencia de este aminoácido en distintas fuentes naturales.

3.9.2 Papel de la L-Leucina en la Anemia de Blackfan-Diamond

El síndrome mielodisplásico con delección aislada de 5q- comparte la misma fisiopatología que la ABD al tener ambas entidades mutaciones en las proteínas ribosomales (Rps14 en el síndrome 5q- y Rps19 el más frecuente en la ABD) creando una haploinsuficiencia y por tanto una anemia grave. La Hipótesis principal se basa en el hecho de que la L-Leucina es un conocido

activador de la translación del mRNA, el cual en estudios experimentales ha demostrado sobre determinados sujetos la disminución de la sintomatología de la ABD. Se sugiere que la vía principal donde actúa la L-Leucina es la **mTOR pathway**.

La L-Leucina y su metabolito el Beta-Hidroxi-Beta-Metilbutirato, estimulan la iniciación de la transducción proteínica a través del complejo mTOR. Esto produciría una disminución en la transcripción proteínica causada por la deficiencia de la proteína ribosomal en los pacientes con ABD.

El estudio experimental de *Payne et al*²¹, puso de manifiesto cómo el aporte de L-Leucina producía beneficios generales en embriones de pez zebra a los que se les había provocado químicamente una haploinsuficiencia de la proteína ribosomal Rps19, (desarrollando el mismo fenotipo que los pacientes con ABD: retraso en el crecimiento y defectos en la organogénesis como defectos craneocefálicos, oftalmológicos y cardíacos). Dichos defectos fueron mitigados con el tratamiento de L-Leucina, así como el fenotipo anémico de los embriones.

3.9.3 Resultados del tratamiento con L-Leucina en estudios experimentales.

Estos efectos coinciden con un incremento en la fosforilación de la diana **S6K1 (Vía mTOR)** pero no en la diana 4E-BP1. El incremento de la fosforilación ha sido evidenciado principalmente en el tejido hematopoyético caudal, uno de los principales sitios de desarrollo y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos. Además, cuando los investigadores estudiaron la haploinsuficiencia de la proteína ribosomal Rps19 en las células humanas CD34+, observaron mejoras en la expansión eritroide tras la suplementación con L-Leucina. Sin embargo, también es necesario evaluar la respuesta de la p53 tras el tratamiento con Leucina para poder evaluar su seguridad y no oncogenicidad.

Cuando se ensaya la eficacia en los pacientes con haploinsuficiencia de la Rps19 tratados y no tratados con L-Leucina, la expresión de las dianas de p53 (el cual tiene su actividad altamente incrementada en los pacientes con haploinsuficiencia de la Rps19) Phlda3 y CCND1, se redujeron significativamente tanto en progenitores mieloides como eritroides junto con la regulación a la baja del inhibidor del ciclo celular CDKN1A (p21), una de las principales dianas del p53.

Se reduce la ubiquitinización y degradación proteosomal del p53: incrementando sus reservas celulares y provocando la supresión hematopoyética²².

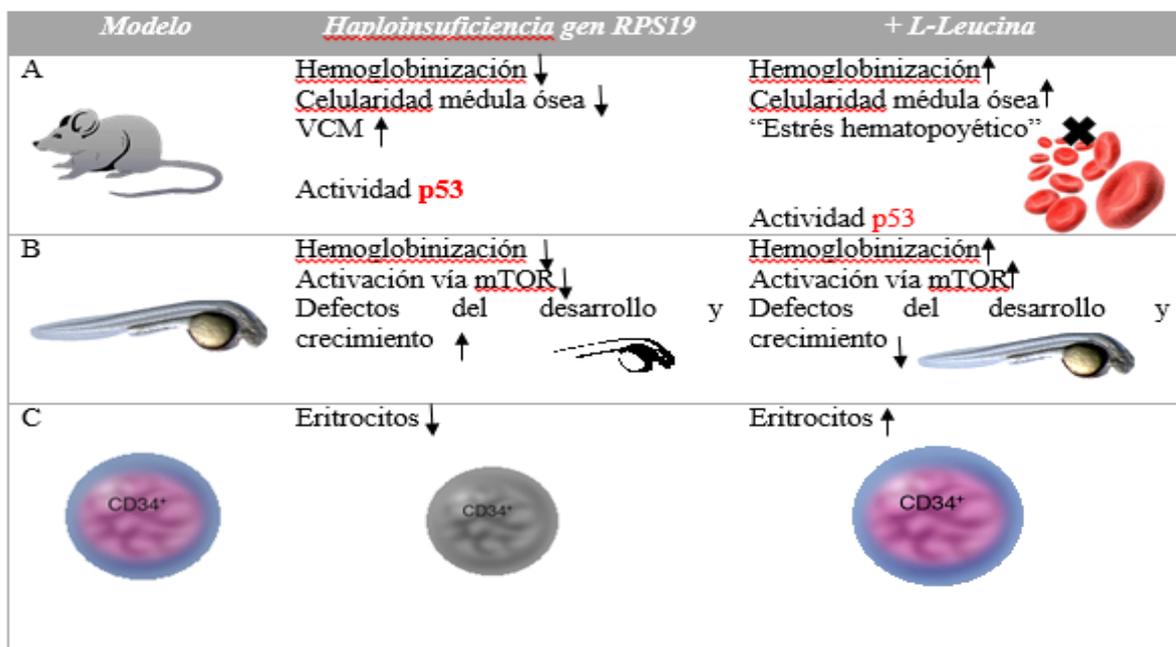


Figura 3. Objetivos clave encontrados en los tres principales sistemas estudiados donde se ha reproducido una haploinsuficiencia en el gen Rps19^{23,21,24}. (A) El ratón inducido por doxiciclina descrito por *Jaako et al²⁴*, mostró una reducción en la hemoglobinización e incremento del volumen corpuscular medio (VCM), con un decrecimiento en la celularidad de la médula ósea, y un evidente incremento en la actividad del p53. La administración de L-Leucina mostró una mejoría de estos síntomas, disminuyendo la actividad del p53, aumentando la hemoglobinización y celularidad de la médula ósea. (B) *Payne et al²¹* demostraron sobre el embrión de pez Zebra con haploinsuficiencia provocada por morfolino, también una disminución de la hemoglobinización, y en de la actividad de la vía mTOR, junto con un significativo aumento de defectos del desarrollo, los cuales fueron parcialmente aminorados con el tratamiento de L-Leucina. (C) La haploinsuficiencia provocada in vitro sobre las células humanas CD34+ realizado por *Payne et al²¹*, demostró una significativa disminución de la diferenciación en las células eritrocitarias. El tratamiento con L-Leucina incrementó el recuento eritrocitario. Ilustración adaptada de Marie Dauenheimer.

Las bases fisiopatológicas demostradas en la ABD han sido la haploinsuficiencia de las proteínas ribosomales y la regulación al alza del protooncogen supresor de tumores p53. Estas mismas bases han sido demostradas en el síndrome mielodisplásico con delección aislada de 5q-. El estudio de *Anupama Narla et al²⁵*, puso de manifiesto que el tratamiento con L-Leucina mejoraba la anemia en ABD y síndrome 5q- (provocando *in vitro* una haploinsuficiencia de las proteínas ribosomales rps19 y rps14, aumentando el nivel de eritrocitos en el embrión). Se demostró que los niveles de p53 y uno de sus principales dianas CDKN1A, se veían transcripcionalmente elevados, lo cual explicaba la continua apoptosis inducida de los eritrocitos. En esta vía tras la administración de L-Leucina en dosis crecientes (10mg hasta 100mg), sí se observaba un aumento de los eritrocitos con respuesta positiva sin ver una regulación a la baja del p53 y su diana CDKN1A, siguiendo elevados tras dosis crecientes de L-Leucina.

Las conclusiones de este estudio demostraron que la **L-Leucina sí es efectiva sobre las mutaciones de Rps19 y Rps14**, aumentando el nivel de eritrocitos, pero a través de una vía independiente del p53, que además, apoya a la seguridad de este tratamiento debido a que una regulación a la baja del p53 podría suponer el aumento de la prevalencia de tumores en los pacientes con ABD tratados con L-Leucina.

La vía por la cual actúa la L-Leucina, es la vía de la mTOR, demostrado por *Jaako et al*²⁴, a través de la cual fosforila y activa distintas dianas como la S6K1, la cual condiciona una cascada de señales activando distintas proteínas ribosomales.

Sus resultados validan el uso de L -leucina para el manejo clínico de estos pacientes debido a que la inactivación de P53, que se asocia con el crecimiento tumoral, no parece ser un factor de confusión en la respuesta de L-leucina de DBA y SMD 5q –

Se tomó como base el ensayo clínico realizado sobre un caso de Anemia de Blackfan-Diamond, realizado por *Pospisilova et al*¹⁵, donde se demostró remisión in vitro e in vivo de una paciente de 6 años tras 9 meses con suplemento de L-Leucina 700gr/día.

4 Objetivos

4.1 Principal:

Evaluación de la respuesta eritropoyética al tratamiento con L-Leucina en los pacientes con anemia de Blackfan-Diamond.

4.2 Secundarios:

Revisión bibliográfica de la clínica, diagnóstico, bases fisiopatológicas de la anemia de Blackfan-Diamond.

Características de una muestra de pacientes con anemia de Blackfan-Diamond (edad, edad de diagnóstico, sexo, mutación ribosomal)

Evaluación de la seguridad de la L-Leucina en los pacientes con anemia de Blackfan-Diamond.

5 Material y métodos

El estudio descriptivo de casos se ha realizado de forma prospectiva sobre siete pacientes con edades comprendidas entre los 3 y los 46 años con diagnóstico molecular confirmado de Eritroblastopenia congénita o Anemia de Blackfan-Diamond. El diagnóstico de estos pacientes ha sido establecido de acuerdo a los criterios del grupo de trabajo de la ABD de la Sociedad Europea de Hematología e Inmunología. Todos los pacientes han sido sometidos a un estudio genético con el fin de obtener el nivel en el cual se encontraba la mutación.

A todos los pacientes se les ha estimado la sobrecarga férrica hepática, medida en micromoles Fe/gr. Esta medida es una estimación obtenida a través de la combinación de secuencias en la resonancia magnética obteniendo planos axiales en T2, T2*, T2**, DP y T1, siguiendo el protocolo de la Universidad de Rennes, para la valoración del ratio IS.

A todos los pacientes se les había administrado L-Leucina (1 gr/m²) tres veces al día, durante 5 meses. Se había realizado en la consulta una valoración basal (previa al tratamiento) y se les repitió a los cinco meses de inicio del tratamiento.

Se realiza análisis con paquete estadístico SPSS 17. Se realiza el test descriptivo y análisis comparativo de las variables cuantitativas mediante el test de Wilcoxon.

El servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital terciario de referencia “Miguel Servet” solicitó la aprobación del comité del CEICA para todos sus pacientes.

5.1 Criterios de eficacia de L-Leucina.

Se considera respuesta al tratamiento con L-Leucina cuando²⁶:

- **Respuesta completa:** Niveles de hemoglobina superiores a 9 g/dL y sin dependencia de transfusiones.
- **Respuesta parcial:** Niveles de hemoglobina inferiores a 9g/dL e incremento de fórmula reticulocitaria mayor en 1% o dependencia de alguna transfusion, sin incrementarse con respecto al ritmo de dependencia transfusional previo.
- **No respuesta:** Sin cambios en los requerimientos transfusionales ni cambios significativos en las cifras de hemoglobina o porcentaje de reticulocitos.

5.2 Criterios de cumplimentación del tratamiento

- Aminoacidograma plasmático: Valoración de los niveles de L-Leucina.
- Cuestionario adherencia al tratamiento Morisky-Green²⁷. Anexo I

6 Resultados

6.1 Descriptivo general pacientes

Al encontrarnos con una enfermedad rara, debido a que su prevalencia se estima en 1/150.000 pacientes en la comunidad Europea, se reclutan a todos los pacientes con diagnóstico de ABD de la consulta de eritropatología del Hospital universitario Miguel Servet donde la muestra contiene 4 mujeres y 3 hombres con edades comprendidas entre los 4 y 46 años.

Paciente	Edad	Sexo	Mutación	Comorbilidades
1	39	Hombre	C282Y heterocigoto	Rodete subaórtico
2	19	Mujer	Exon3 RPS19	No
3	4	Hombre	Exon 6 RPL5	CIV Arco aortico derecho con arteria subclavia aberrante
4	13	Mujer	Exon4 RPS19	No
5	40	Hombre	Exon5 RPS19	No
6	20	Mujer	Intron3 RPS19	No
7	46	Mujer	Exon4 RPS19	No

Tabla 1. Mutación y comorbilidades

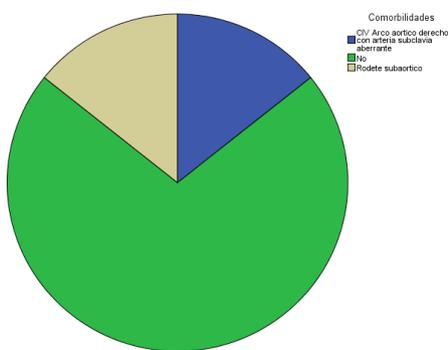


Figura 4. Comorbilidades presentes en la muestra.

6.2 Descriptivo genética pacientes

El estudio genético de los pacientes con anemia de Blackfan-Diamond ha permitido demostrar la variedad que presenta esta patología en la herencia, demostrando, como se ha mencionado antes, que puede existir *herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta y expresión variable y mutaciones de novo*. Aproximadamente el 55-60% de los pacientes presentan una mutación aparecida de novo, mientras que el otro 40-45% de los pacientes han heredado la mutación de uno de sus progenitores que también estaría afecto.

Aproximadamente el 53% de los pacientes afectados de Anemia de Blackfan-Diamond presentan mutaciones en alguno de los nueve genes descritos que se distribuyen de la siguiente manera: RPS19 (25%), RPL5 (6,6%), RPS19 (6,4%), RPL11 (4,8%), RPL35A(3%), RPS10 (2,6%), RPS24(2%) , RPS17(1%) y RPS7(1%).

El gen RPS19 se encuentra situado en la región cromosómica 19q13.2, su región codificante consta de 6 exones, 5 de los cuales codifican para una proteína ribosomal , de la familia S19E, que es un componente de la subunidad 40S del ribosoma.

El estudio molecular²⁸ de los genes más frecuentemente implicados en la patogénesis, nos ha permitido demostrar las numerosas localizaciones y variedades al nivel al cual están mutados, provocando diferente sintomatología y gravedad del curso en función del nivel al cual estos se mutan y en función del gen finalmente mutado. Este descriptivo pretende mostrar una visión global de los 7 pacientes incluidos en el estudio junto con la sintomatología que los mismos presentan, con el fin de sentar las bases para poder realizar futuras hipótesis y campos donde abordar el manejo terapéutico de estos pacientes.

1: El cuadro clínico del paciente no es debido a la presencia de mutaciones puntuales en las regiones analizadas de los genes RPS19 ni RPL5. El paciente no desea continuar con estudio genético.

Sin embargo, en estudio genético realizado previamente en 1998 al paciente, presentó heterocigosis para la mutación C282Y en el cromosoma 6, M/N, diagnosticándose así de portador de hemocromatosis, siendo esta enfermedad autosómica recesiva, se necesitan dos alelos afectados para manifestarse.

2: La paciente presenta una mutación en el exón 3 del gen RPS19 en heterocigosis, lo cual provoca la duplicación c135_138dupTGCT, que supone un cambio de lectura (frameshift) a partir de este punto (codón 47) y provoca la inmediata aparición de un codón de terminación (p.Pro47CysfsX4) que hace que la proteína para la que codifica este gen esté truncada y posea 50 aminoácidos frente a los 145 de la proteína normal. Esta mutación no había sido descrita previamente como una mutación asociada al desarrollo de Anemia de Blackfan- Diamond, pero al tratarse de una duplicación que provoca una proteína truncada desde el exón 4 del gen RPS19 (p.Pro47CysfsX4), no existe ninguna duda sobre su patogenicidad.

3: El paciente presenta en heterocigosis una mutación en el exón 6 del gen RPL5, la delección a nivel del c683_686delAGAA, supone un cambio de lectura (frameshift) y provoca la

aparición de un codón de terminación, que hace que la proteína para la que codifica este gen esté truncada y posea 229 aminoácidos frente a los 297 de la proteína normal. Esta delección no había sido descrita previamente como una mutación asociada al desarrollo de Anemia de Blackfan-Diamond, pero al tratarse de una delección que provoca una proteína truncada desde el exón 6 del gen RPL5, no existe duda sobre su patogenicidad.

4:La paciente presenta en heterocigosis una mutación en el exón 4 del gen RPS19. La delección que presenta, c251_252delGA supone un cambio en la pauta de lectura (frameshift) a partir de ese punto, codón 84 y provoca un desplazamiento del codón de terminación, que hace que la proteína para la que codifica este gen sea más larga de lo habitual y posea 151 aminoácidos frente a los 145 de la proteína normal, además de variar la composición aminoacídica de los últimos residuos. Esta delección ha sido descrita previamente como una mutación asociada al desarrollo de la anemia de Blackfan-Diamond.²⁸

5: El paciente presenta la variante missense p.Thr124Ile en la posición 371 (c.371 C>T) del exón 5 del gen RPS19, presente esta variante en heterocigosis. Esta variante supone el cambio del codón 124 del gen RPS19, el cual codifica para el aminoácido Treonina, por un codón de **Isoleucina**.

Este cambio nucleotídico no ha sido descrito previamente ni como un polimorfismo ni como una mutación asociada al desarrollo de la ABD, por lo que no es posible predecir su significado clínico. No obstante, esta variante afecta a un residuo muy conservado evolutivamente y, además, el cambio de aminoácido afecta a las características físico-químicas de la proteína. Por ello, en los programas de predicción consultados, los diferentes algoritmos utilizados predicen que este cambio aminoacídico sí afectaría a la función de la proteína, pudiéndose tratar muy probablemente de una mutación patogénica.

6: La paciente presenta una mutación en el intrón 3 del gen RPS19, en forma de heterocigosis. Esto presenta el cambio nucleotídico c172+1G>A, que afecta al sitio donante de splicing (regulador de la trasducción) del intrón 3. Esta mutación podría inducir un fallo de splicing de la proteína, teniendo como consecuencia un splicing aberrante en el mRNA de la proteína codificada por el gen RPS19, que provocaría que la proteína no fuera funcional.

Aunque el cambio nucleotídico c172+1G>A no ha sido previamente descrito como una mutación asociada a la Anemia de Blackfan-Diamond, al tratarse de una mutación que afecta al splicing de la proteína, no existe duda sobre su patogenicidad. Además, otras dos variantes en el

mismo nucleótido (c172+1G>C y c.172+1G>T) si han sido caracterizadas en pacientes afectados por ABD.

7 : La paciente presenta una mutación del exón 4 del gen RPS19 en heterocigosis. Presenta la delección c251_252delGA , que supone un cambio en la pauta de lectura (frameshift) a partir de este punto, codón 84, y provoca un desplazamiento del codón de terminación , que hace que la proteína para la que codifica este gen sea más larga de lo habitual y posea 151 aminoácidos frente a los 145 de la proteína normal, además de variar la composición aminoacídica de los últimos 69 residuos. Esta delección ha sido descrita previamente como una mutación asociada al desarrollo de la ABD. La madre presenta exactamente la misma mutación que la hija, 4.

6.3 Descriptivo sobrecarga de hierro.

<i>Paciente</i>	<i>Sobrecarga de hierro</i> (μ moles Fe/gr)	<i>Niveles de Hefcidina</i> (ng/ml)	<i>Síntomas de enfermedad</i>
1	190	.	No
2	50	17,00	No
3	0	14,00	No
4	20	7,00	No
5	120	22,00	No
6	120	24,00	No
7	.	56,00	Sí

Tabla 2. Sobrecarga de hierro y niveles de hepcidina.

6.4 Descriptivo parámetros analíticos de los pacientes

6.4.1 Serie roja: Hematimetría....página 17-19

6.4.2 Recuento reticulocitario.....página 20,21

6.4.3 Metabolismo del hierro.....página 21,22

6.4.1 Serie roja: Hematimetría

Valor medido	N total	Media	Mediana	Desviación típica	Intervalo de confianza (95%)
VCM tiempo 0 (fL)	7	105,81	106,00	10,38	89,43-118,48
VCM tiempo 3 (fL)	6	105,9	105,95	8,45	94,37-117,82
EPO tiempo 0 (mU/mL)	7	1440,08	690,00	1503,92	49,18-2830,98
EPO tiempo 3 (mU/mL)	5	1874,200	1892,00	1188,32	398,70-3349,69
HbF tiempo 0 (%)	7	4,0286	1,800	3,50	0,664-7,74
HbF tiempo 3 (%)	6	4,3667	4,15	3,560	0,52-7,60
eADA tiempo 0 (U/L)	5	26,12	30,40	10,79	12,71-39,52
eADA tiempo 3 (U/L)	5	23,74	30,20	9,88	11,46-36,01
Hb tiempo 0 (g/dL)	7	9,61	9,00	1,94	7,57-12,42
Hb tiempo 3 (g/dL)	6	9,46	9,10	2,34	6,44-12,83

Tabla 3. Medidas descriptivas de la hematimetría de la muestra.

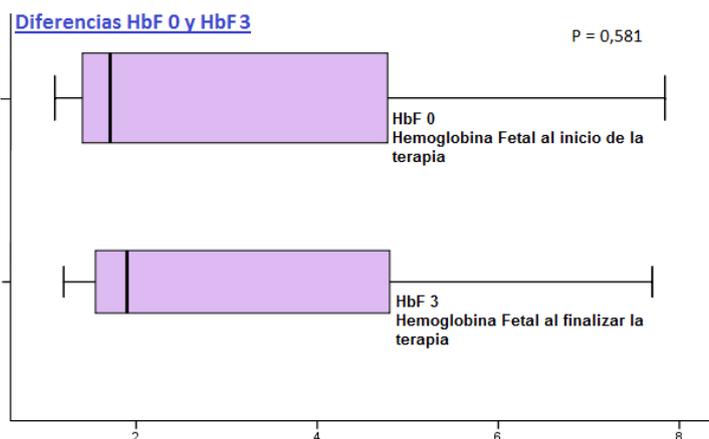


Gráfico 1. Comparación en diagrama de cajas de hemoglobina fetal al inicio de la terapia y al final

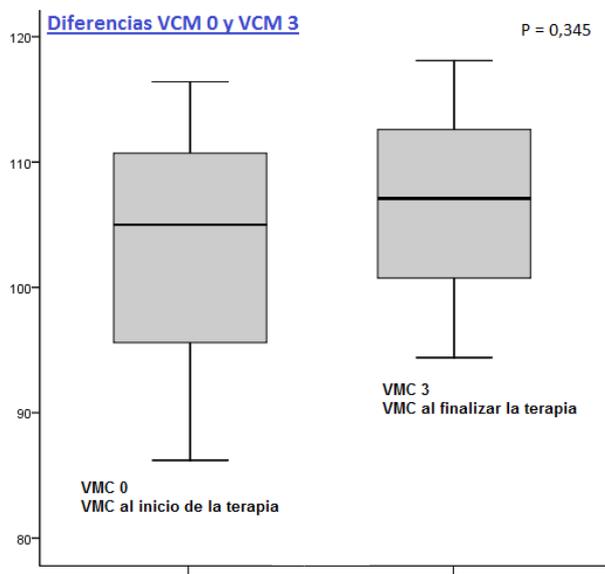


Gráfico 2. Comparación en diagrama de cajas del VCM al inicio de la terapia y al final

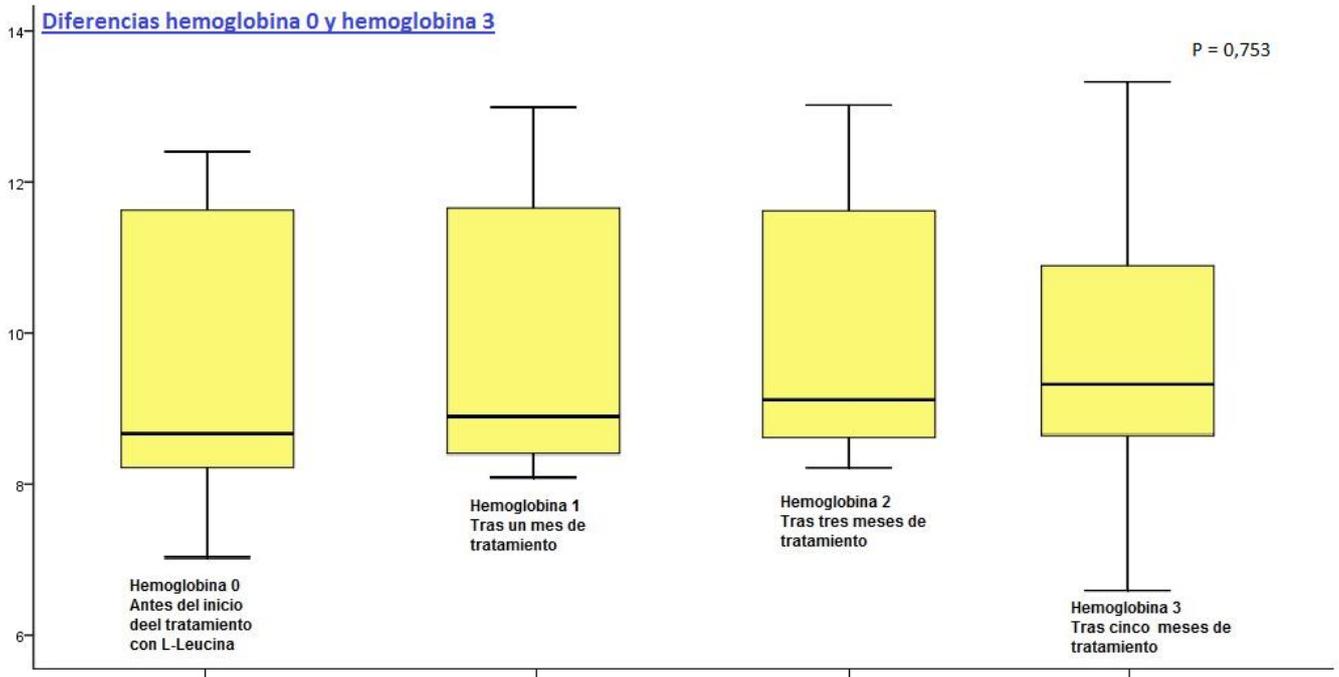


Gráfico 3. Diagrama de cajas que compara la evolución de la hemoglobina antes del inicio de la terapia, como a lo largo del tratamiento, al mes, a los tres meses y a los cinco meses.

Seguimiento de la evolución de los niveles de Hemoglobina antes (Hb0) y durante el tratamiento (Hb1,Hb2,Hb3) con L-Leucina

Evolución por paciente de la determinación de hemoglobina en el tiempo.

- Hb0: Un mes antes del tratamiento con L-Leucina.
- Hb1: Un mes después del tratamiento con L-Leucina
- Hb2: A los tres meses del tratamiento con L-Leucina
- Hb3: A los cinco meses del tratamiento con L-Leucina

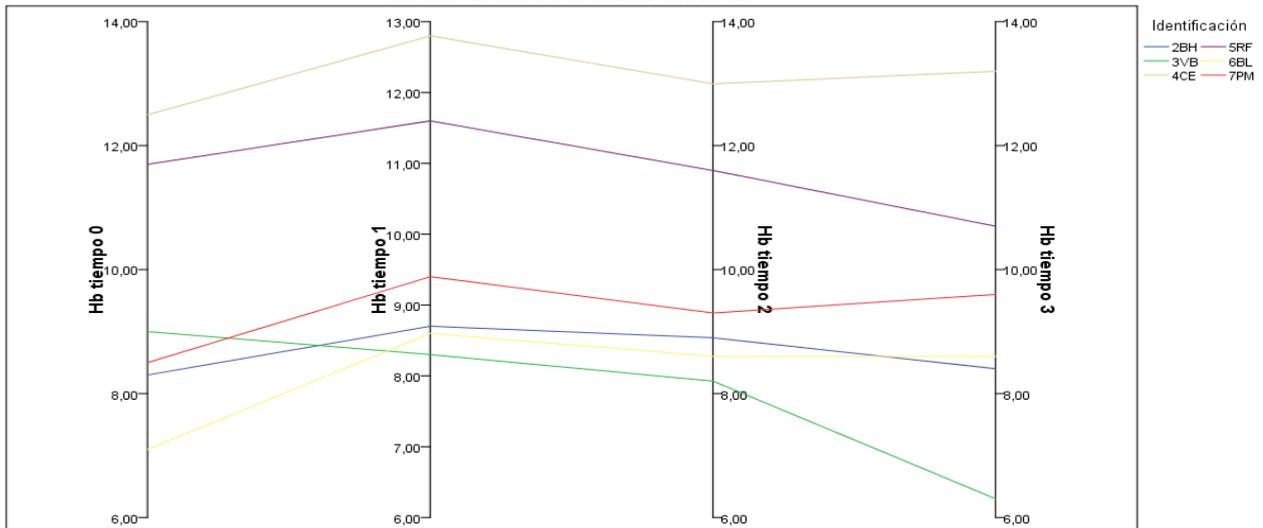


Figura 5. Comparación en paralelo de la evolución de la hemoglobina caso por caso

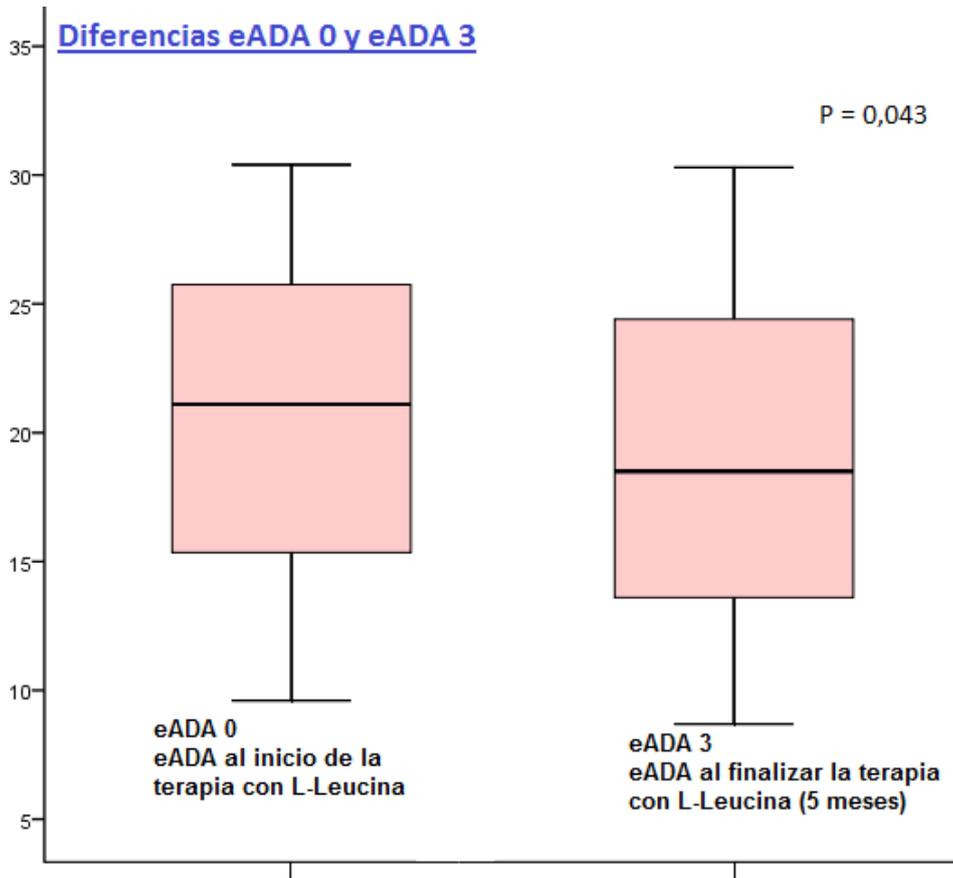


Gráfico 4. Diagrama de cajas que compara la enzima Adenosin-D-Aminasa al inicio de la terapia con respecto al final del tratamiento con L-Leucina.

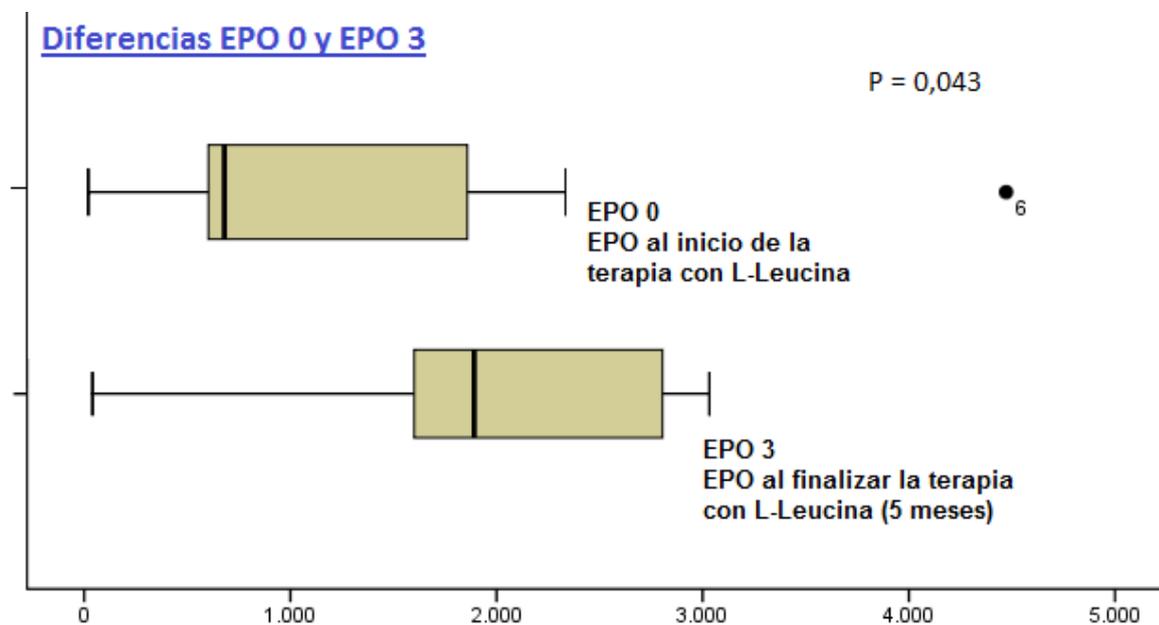


Gráfico 5. Diagrama de cajas que compara la EPO al inicio de la terapia con respecto al final del tratamiento con L-Leucina.

6.4.2 Recuento reticulocitario

Valor medido	N total	Media	Mediana	Desviación típica	Intervalo de confianza (95%)
Reticulocitos totales tiempo 0 ($10^3/\mu\text{L}$)	7	55,24	54,64	25,11	22,95-95,08
Reticulocitos totales tiempo 3 ($10^3/\mu\text{L}$)	6	41,56	47,52	14,64	20,37-59,33
Porcentaje reticulocitos totales tiempo 0 (%)	7	1,75	1,71	0,79	0,527-2,90
Porcentaje reticulocitos totales tiempo 3 (%)	6	1,66	1,81	0,76	0,557-2,65
Fracción reticulocitos inmaduros tiempo 0	7	0,38	0,41	0,12	0,267-0,556
Fracción reticulocitos inmaduros tiempo 3	6	0,31	0,32	0,08	0,186-0,417

Tabla 4. Medidas descriptivas del recuento reticulocitario de la muestra.

Diferencias fracción reticulocitos inmaduros 0 y reticulocitos inmaduros 3

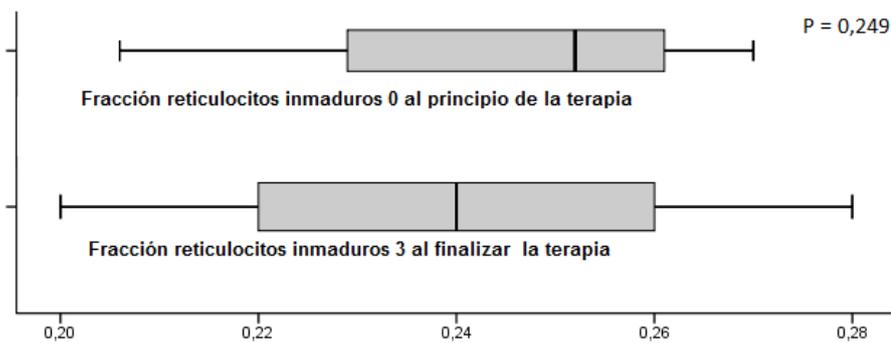


Gráfico 6. Caja de frecuencias que compara la fracción de reticulocitos inmaduros al principio y al final de la terapia con L-Leucina

Diferencias contaje reticulocitario total 0 y contaje reticulocitario total 3

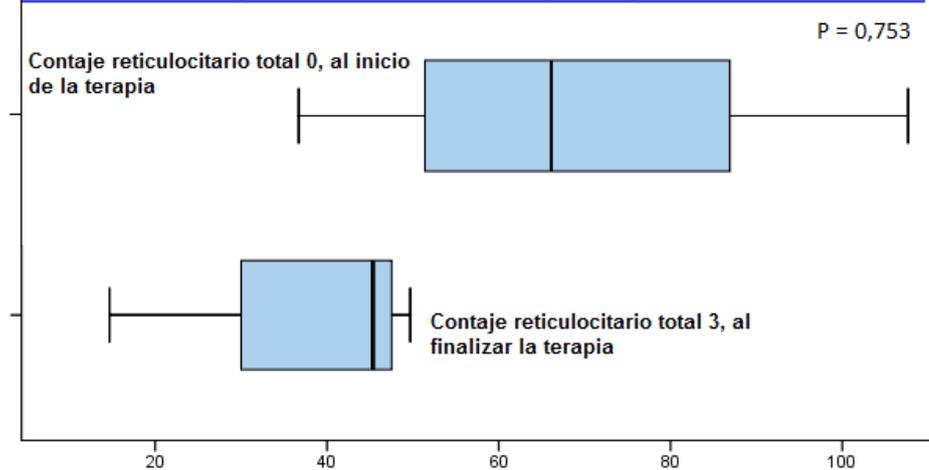


Gráfico 7. Caja de frecuencias que compara el contaje reticulocitario total al principio y al final de la terapia con L-Leucina

Diferencias porcentaje reticulocitos totales 0 y porcentaje reticulocitos totales 3

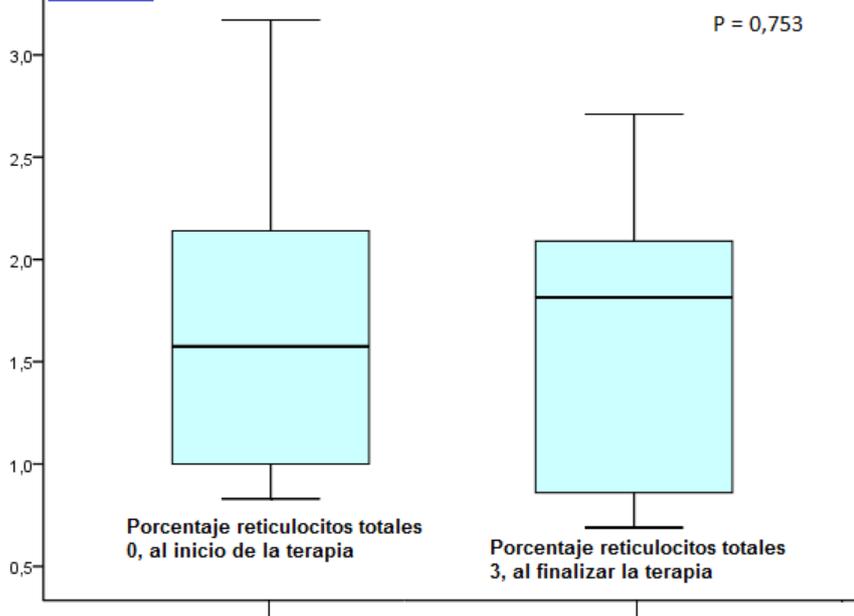


Gráfico 8. Caja de frecuencias que compara el porcentaje de reticulocitos totales al principio y al final de la terapia con L-Leucina

6.4.3 Metabolismo del hierro

Valor medido	N total	Media	Mediana	Desviación típica	Intervalo de confianza (95%)
Hierro tiempo 0 ($\mu\text{g/dL}$)	7	132,85	121,00	50,44	52,87-179,52
Hierro tiempo 3 ($\mu\text{g/dL}$)	6	120,16	120,50	23,52	87,97-153,22
Ferritina tiempo 0 (ng/dL)	7	237,35	185,60	176,44	41,08-424,88
Ferritina tiempo 3 (ng/dL)	6	183,51	191,00	86,40	58,90-282,73
Transferrina tiempo 0 (mg/dL)	7	216,21	209,60	20,56	190,03-246,72
Transferrina tiempo 3 (mg/dL)	6	242,36	236,50	27,86	207,81-282,66
IST tiempo 0 (%)	7	43,28	42,19	16,66	17,66-57,20
IST tiempo 3 (%)	6	34,88	34,49	8,28	23,14-46,08

Tabla 5. Medidas descriptivas del metabolismo del hierro de la muestra.

Diferencias hierro 0 y hierro 3

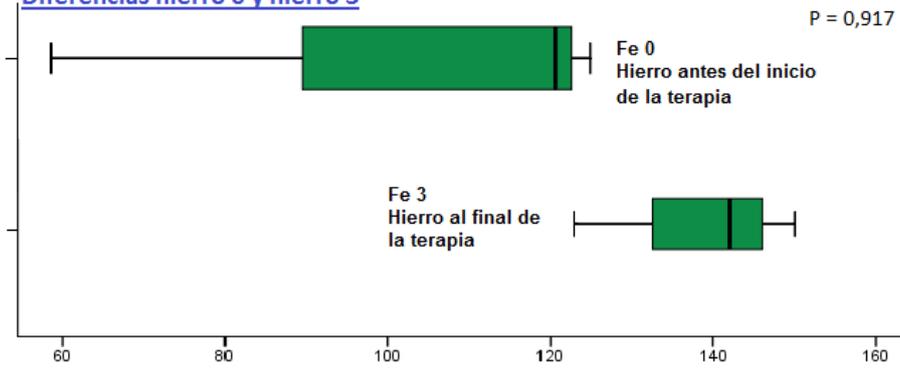


Gráfico 9. Caja de frecuencias que compara el hierro al principio y al final de la terapia con L-Leucina

Diferencias ferritina 0 y ferritina 3

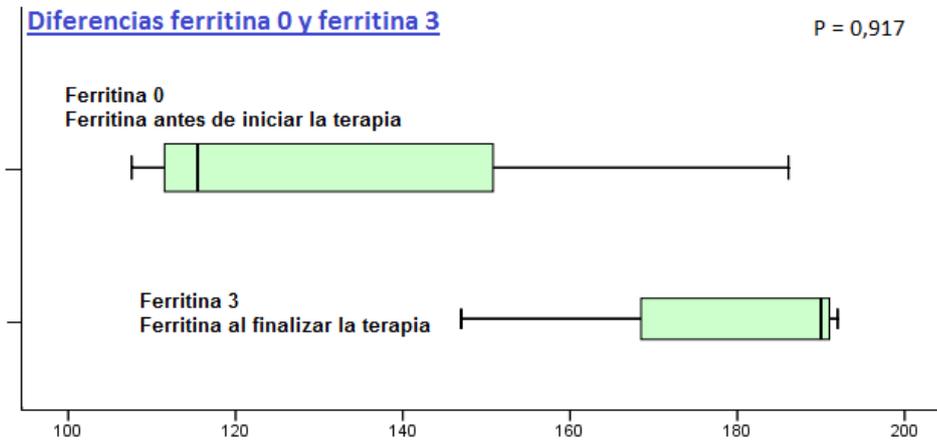


Gráfico 10. Caja de frecuencias que compara la ferritina al principio y al final de la terapia con L-Leucina

Diferencias transferrina 0 y transferrina 3

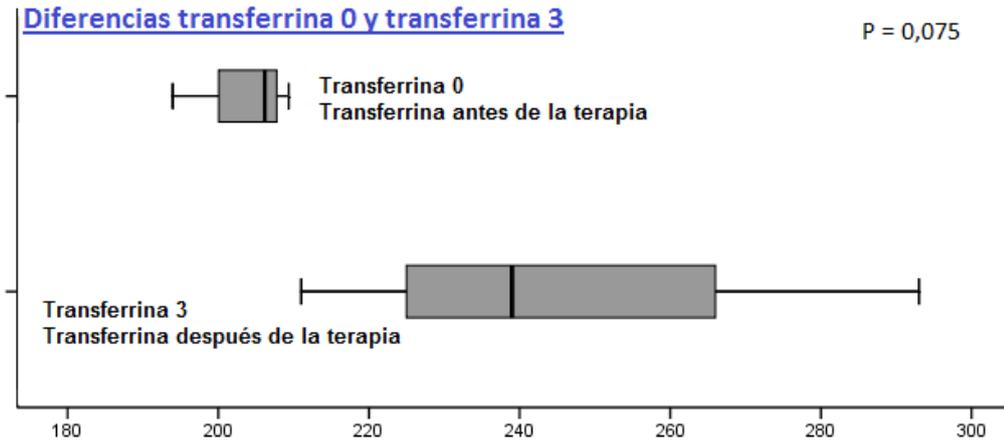


Gráfico 11. Caja de frecuencias que compara la transferrina al principio y al final de la terapia con L-Leucina

6.5 Descriptivo aminoacidograma

Paciente	Aminoácidos alterados tras 1 mes con L-Leucina	Valor alterado (nmol/mL)	Valores Normalidad (nmol/mL)	Aminoácido alterado al final de la terapia	Valor final (nmol/mL)	
1	No se disponen de datos					
2	Asparagina	129,20	20-125		96,42	
	Arginina	25,45	40-130		63,73	
Resto valores en rango de normalidad						
3	Taurina	19,25	20-80		22,16	
	Metionina	7,83	10-40		26,73	
	Isoleucina	18,60	35-90	Isoleucina	11,22	
	Histidina	45,54	50-100	Histidina	47,93	
			55-150	Leucina	202,05	
Resto valores en rango de normalidad						
4	Alanina	362,75	125-350		327,47	
	Ornitina	106,46	30-100		67,91	
				10-50	Ac.Glutamico	7,53
Resto valores en rango de normalidad						
5	Ornitina	114,74	40-100	Ornitina	136,03	
				20-125	Asparagina	135,92
				150-400	Alanina	436,28
				80-250	Valina	334,94
				30-100	Isoleucina	100,01
				25-75	Tirosina	83,90
				50-200	Leucina	208,14
Resto valores en rango de normalidad						
6						
7	No se han encontrado alteraciones		65-250	Treonina	258,37	
			20-125	Asparagina	133,85	
			150-400	Alanina	424,62	

Tabla 6. Descriptivo aminoacidograma

6.6 Descriptivo calidad de vida

Paciente	Morisky- Green . Adherencia pre-test ²⁷	Morisky- Green post-test	Karnofsky Pre-test ²⁹	Karnofsky post-test	Intensidad Fatiga Bulbena y Cols pre- test ³⁰	Intensidad Fatiga Bulbena y Cols post- test	EEAG pre-test ³¹	EEAG post-test
----------	---	--------------------------------	-------------------------------------	------------------------	--	---	--------------------------------	-------------------

1	No datos							
2	Sí	Sí	100	100	63(Max)	59	99-81	90-81
3	No datos							
4	Media	Media	90	90	56		90-81	90-81
5	Si	Si		80		52		80-71
6	No datos							
7	Sí	Sí	70	80	46	44	70-61	70-61

Tabla 7. Descriptivo cuestionario de evaluación calidad de vida y adherencia al tratamiento.

6.7 Descriptivos criterios de remisión en la muestra

Remisión

Paciente	SÍ	PARCIAL	NO
1	No es evaluable. Caso perdido		
2	PARCIAL		
3	NO		
4	NO		
5	NO		
6	NO		
7	PARCIAL		

Tabla 8. Criterios de remisión

7. Discusión.

7.1 Limitaciones del estudio:

Este estudio se ha encontrado con una serie de limitaciones: La principal limitación del estudio se refiere a la muestra estudiada, debido a ser una enfermedad muy rara, con una tasa de incidencia de 5-10 casos por millón al año.

La segunda limitación principal ha sido el tiempo determinado para el estudio de la evolución de los pacientes, debido al tiempo acotado de cinco meses de observación, en comparación con el estudio de referencia cuyo tiempo idóneo para obtener remisión fue de nueve meses.¹⁵

Finalmente, la principal limitación que nos hemos encontrado ha sido la heterogeneidad de la muestra, debido a que cada paciente presenta una mutación distinta, que como se describirá más adelante, determina la agresividad de la enfermedad, recibe además un tratamiento distinto, y diferentes coadyuvantes en su tratamiento, como EPO, o transfusiones. Nos encontramos además con la variabilidad de la edad en la muestra y las enfermedades concomitantes de cada sujeto de la misma. Además, nos encontramos con la pérdida de un paciente (1) debido a la falta de datos evaluables.

Una última limitación en el estudio se basa en no ser un ensayo clínico controlado con placebo en el cual se pueda ver un real cambio con respecto al grupo control en el uso de L-Leucina, que impide obtener conclusiones sólidas respecto al uso de L-Leucina.

7.2 Discusión del estudio

7.2.1 Generales

- La media de la edad de la muestra se encuentra en 21 años, estando los valores límite entre 4 años y 40 años, con una desviación típica del 18,083, mostrándonos la disparidad de las edades de los sujetos.

- No se han encontrado en ningún paciente alteraciones en la bioquímica sanguínea, controlando la función hepática, renal, proteínica y metabolismo.

- Las necesidades transfusionales no han presentado variaciones.

- En el aminoacidograma, observamos variaciones, las cuales no han sido analizadas estadísticamente ni interpretadas. Las variaciones observadas, son tanto al alza como a la baja del metabolismo de los llamados aminoácidos esenciales los cuales deben ser captados como parte de los alimentos, y la carencia de los mismos limita el desarrollo del organismo. Las variaciones encontradas en el total de la muestra, debido a que impredeciblemente cada sujeto ha presentado

distintas variaciones, han sido en los aminoácidos Valina, Isoleucina, Tirosina, Ornitina, Asparragina, Alanina, Histidina, Treonina, y finalmente, Leucina , el cual era la razón principal de determinación del aminoacidograma para la monitorización de la toma de este aminoácido por vía exógena. También se ha observado la variación en un paciente del ácido glutámico.

Llama la atención que los dos pacientes, 3 y 5, que más sintomatología presentan junto con unas alteraciones genéticas más relevantes y una peor respuesta al uso de L-Leucina, sean los mismos que tienen un aminoacidograma más alterado, tanto pre-terapia, como sobre todo post-terapia.

-La calidad de vida, según los distintos test de evaluación de calidad de vida obtenidos, no se han observado cambios.

7.2.2 Metabolismo del hierro

- Con respecto al metabolismo del hierro, nos encontramos ante una elevación del hierro en todos los pacientes excepto en dos, en los cuales hay una ligera disminución de las cifras de hierro , 6 y 7 .

La ferritina presenta una tendencia al alza en los mismos pacientes en los que se producía una elevación del hierro, excepto en 6 y 7, en las cuales, al igual que antes, las cifras de ferritina disminuyen.

Hemos observado ligeras variaciones en las cifras de transferrina de todos los pacientes, algunas al alza como el caso de 2 y 7 , otras a la baja, como 4, sin embargo, son variaciones mínimas consideradas dentro de la fisiología normal. Nos encontramos en el resto de pacientes variaciones más relevantes en las cifras de transferrina, como 3 al alza, 5 al alza y 6 al alza.

Finalmente, nos encontramos con unas cifras del índice de saturación de transferrina estables, vistas en 4, una elevación significativa en una paciente, la cual no había modificado las cifras de transferrina circulante de forma significativa, aunque sí de hierro y ferritina, es el caso de 2, que prácticamente dobla la saturación de la transferrina. El resto de pacientes, 3,5, disminuyen sus cifras del índice de saturación de transferrina, estos tan sólo en un 10%, pero 6 y 7, en las que su cifra de índice de saturación de transferrina se reduce prácticamente en un 30%, encontrándose en este momento en rangos de normalidad.

No podemos esclarecer el porqué de los cambios en el metabolismo del hierro, y contrariamente a lo esperado y constatado por el estudio de referencia¹⁵, podríamos pensaren que la L-Leucina facilitaría una liberación del hierro el cual habría sido secuestrado, provocando así mismo una elevación en su transportador.

7.2.3 Contaje reticulocitario

La tendencia del contaje de reticulocitos totales y la fracción de reticulocitos inmaduros es a la baja, pero el porcentaje de reticulocitos totales es al alza. Estos datos podrían suponer un avance en la maduración reticulocitaria.

7.2.4 Hematimetría, EPO, eADA y genética en relación a cada paciente

- En nuestra serie de casos no hemos observado un incremento en las cifras de hemoglobina a lo largo del tratamiento con L Leucina, a pesar de que sí hemos encontrado una tendencia, en donde dos sujetos disminuían sus cifras de hemoglobina al cabo de tres meses de terapia con L-Leucina, mientras que los otros cuatro, conseguían mantenerse en las cifras de hemoglobina que presentaban antes e incluso elevándolas ligeramente. Sin embargo, estas cifras no se deberían analizar aisladamente debido a, como se ha comentado antes, cada paciente presenta una mutación distinta, la cual, descrita en el apartado de descriptivo de genética, podría condicionar un proceso más o menos agresivo del cuadro, por lo que analizamos a cada paciente y mutación en particular con su respectiva evolución en las cifras de hemoglobina.

El primer paciente, 3, que más significativamente ha disminuido sus cifras de hemoglobina y además ha requerido de soporte transfusional, es el único paciente que muestra la mutación en el RPL5, la única descrita que podría simular un síndrome de Teacher-Collins², el cual además presenta una anomalía congénita cardíaca (CIV y arco aórtico derecho con arteria subclavia aberrante), el mismo paciente que debutó con un cuadro grave de anemia de lactante, siempre con cifras de hemoglobina muy disminuidas en torno a 6 g/dl y que ha presentado durante toda la evolución una clínica más agresiva. Además, se añade a este proceso la coexistencia durante el tratamiento de proceso infeccioso, requiriendo visita a urgencias, revisión por parte de hematología y transfusión de 1CH. Este paciente presenta en el exón 6 del gen RPL5, la cual supone la aparición de un codón de terminación, que hace que esta proteína posea 229 aminoácidos frente a los 297 de la proteína normal. Esta delección no había sido descrita previamente en el cuadro de ABD, pero en este paciente en concreto, supone además el cuadro más agresivo que el resto de los sujetos de la muestra, teniendo en todo momento presente la edad del paciente (4 años) y la frecuencia con la que este paciente enferma, probablemente debido a las características propias de los infantes.

El segundo paciente a tratar, corresponde a 5, en el cual se ha observado una discreta disminución en sus cifras de hemoglobina, sin condicionar esto un cambio del régimen terapéutico

habitual. Este paciente, curiosamente, presenta una variante missense del exón 5 del gen RPS19, , la cual supone el cambio del codón 124 del gen RPS19, el cual codifica para el aminoácido Treonina, por un codón de **Isoleucina**, el cual no había sido descrito previamente asociado a la ABD. Cabe destacar además, que este paciente tenía un hermano gemelo, que presentaba también ABD, el cual, debido a la terapia corticoidea, se encontraba en estado de inmunosupresión y falleció por una neumonía fúngica rápidamente progresiva (sin especificar). Sin embargo, a pesar de ser uno de los dos pacientes que ha disminuido sus cifras levemente durante el tratamiento con L-Leucina, sus cifras se encuentran dentro de un rango de anemia aceptable.

La tercera paciente a tratar corresponde a 2, la cual se ha mantenido estable en sus cifras de hemoglobina durante el tratamiento con L-Leucina, tampoco ha requerido modificaciones en el tratamiento corticoideo de base. La paciente presenta una mutación en el exón 3 del gen RPS19 la cual provoca un cambio de lectura a partir del codón 47 y provoca la inmediata aparición de un codón de terminación que hace que la proteína posea 50 aminoácidos frente a los 145 de la proteína normal. Esta mutación tampoco había sido descrita previamente.

El resto de los pacientes, en especial 7 y 4 , mantienen sus cifras habituales de hemoglobina e incluso presentan una ligera tendencia al alza, estas dos pacientes, presentan una mutación en el exón 4 del gen RPS19 , la cual supone un cambio en la pauta de lectura del codón 84 provocando un desplazamiento del codón de terminación, haciendo una proteína más larga de lo habitual de 151 aminoácidos frente a los 145 de la normal, variando además la composición aminoacídica de los últimos residuos.

Finalmente, la última paciente evaluable, 6 , ha mantenido cifras estables, de hemoglobina en los tres últimos tiempos, aunque sí ha demostrado un cambio sustancial con respecto a la hemoglobina en tiempo cero, sin embargo este cambio no puede ser atribuido al uso del tratamiento, debido a la escasez de valores de la paciente y la estabilización en las cifras de hemoglobina posterior. La paciente presenta una mutación en el intrón 3 del gen RPS19, presentando el cambio nucleotídico que afecta al sitio regulador de la trasducción del intrón 3, teniendo como consecuencia un splicing aberrante en el mRNA de la proteína codificada por el gen RPS19, que provocaría que la proteína no fuera funcional.

Curiosamente, con respecto a la evolución observada en las hemoglobinas teniendo en cuenta la mutación presentada por el paciente, es puntualizable como los pacientes que peor han

evolucionado durante la terapia y más difícilmente se hace su control anémico, son aquellos que presentan un stop en la codificación de la proteína, o un cambio aminoacídico; mientras que aquellos donde sólo se afecta la trasducción de la proteína o se crea una más grande que la normal, la enfermedad no es tan agresiva.

Sin embargo, a pesar de no cumplir criterios de remisión establecidos inicialmente por *Pospisilova et al*¹⁵ en el caso índice, hay que tener en cuenta cómo en su estudio, a los tres meses del tratamiento la hemoglobina de la paciente sujeto disminuyó con respecto a la inicial, para finalmente incrementarse significativamente a los seis y nueve meses de tratamiento. Esto nos proporcionaría la necesidad de continuar el tiempo del tratamiento hasta un tiempo de nueve meses donde se alcanzase la significación estadística. Además cabe destacar el punto clave de la fisiología de un hematíe, en el cual su vida media es de 120 días, y podría no haber dado tiempo a crear hematíes nuevos debido al estímulo que podría estar realizando la L-Leucina sobre la médula ósea hematopoyética.

En contraste, sí que nos encontramos con una remisión parcial de dos pacientes (7 y 2), como observaremos después, debido a que, a pesar de mantener unas cifras de hemoglobina estables con respecto a las previas, o ligeramente con tendencia al alza, sí presentan un incremento mayor al 1% en la fórmula reticulocitaria.

En el volumen corpuscular medio (VCM) no se han observado diferencias, en tres pacientes se eleva (2,3,5) curiosamente los que presentan peores mutaciones y en otros tres disminuye muy levemente (4,6,7), sin embargo, no se consideran cambios significativos.

En cuanto al objetivo de disminución del porcentaje de hemoglobina fetal (HbF), en el volumen de la muestra no se han encontrado diferencias, en dos pacientes se mantienen en las mismas cifras (2,4), en otros dos se eleva ligeramente (3,5) curiosamente, además, coincidiendo en que siguen siendo los que presentan peores mutaciones y clínica más agresiva, y finalmente en los últimos dos disminuye mínimamente (7,6).

Con respecto a los niveles de eritropoyetina, cuya su disminución, acompañada de la elevación de la hemoglobina, sería un criterio de remisión en nuestros pacientes, se produce de forma estadísticamente significativa, con una $p < 0,05$, una tendencia al alza de todos los pacientes. Hemos observado que el aumento de EPO coincide con un incremento de reticulocitos y de la

maduración reticulocitaria sugiriendo de esta manera una progresión latente de la eritropoyesis aunque aún no llegue a alcanzar una maduración completa con presencia de un incremento significativo eritrocitos y por tanto de hemoglobina. Estos datos no pueden ser comparados con el estudio original ya que en el mismo sólo presentaron los niveles de EPO al principio y al final de la terapia, nueve meses más tarde.

Se ha observado una tendencia a la disminución de los niveles de eADA contrastados al inicio del tratamiento y al finalizar el mismo. Esta disminución es significativamente estadística encontrándonos con una $p < 0,05$. A pesar de no saber a qué nivel interfiere la enzima ADA en esta enfermedad, creemos que está íntimamente ligada y relacionada con la elevación de la EPO, e incremento del porcentaje reticulocitario, sugiriendo como antes hemos comentado, una progresión latente de la eritropoyesis.

8. Conclusiones.

- 8.1 La introducción de L-leucina en nuestros pacientes con ABD no ha mostrado diferencias en el incremento de los niveles de Hemoglobina, ni disminución del VCM ni del porcentaje de Hb F.
- 8.2 En determinados pacientes (7 y 2), L-leucina, sí que ha generado una respuesta parcial, con incremento en el porcentaje de reticulocitos mayor al 1%, y en ocasiones concomitante al incremento de las cifras de hemoglobina.
- 8.3 La introducción de L-leucina en nuestros pacientes con ABD ha mostrado diferencias en el incremento de los niveles de eritropoyetina sérica. Este incremento coincide con un incremento del porcentaje reticulocitario y de la disminución de los reticulocitos inmaduros.
- 8.4 La terapia con L-leucina produce una disminución de los niveles de eADA desde el inicio del tratamiento hasta el periodo inicial de evaluación (5 meses) que se muestra en estrecha relación con el aumento de los niveles séricos de Eritropoyetina.
- 8.5 La toma de L-leucina no ha generado intolerancias ni efectos adversos.

9. Bibliografía

- ¹Anemia de Blackfan-Diamond. Orphanet [http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=ES&data_id=429&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Blackfan-Diamond&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Enfermedade(s)/grupo%20de%20enfermedades=Enfermedad-de-Blackfan-Diamond&title=Enfermedad-de-Blackfan-Diamond&search=Disease_Search_Simple]
- ²Jeffrey M. Lipton, and Steven R. Ellis . Diamond Blackfan Anemia: Diagnosis, Treatment and Molecular Pathogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009 April ; 23(2): 261–282. doi:10.1016/j.hoc.2009.01.004
- ³ Vlachos A, Ball S, Dahl N, et al. Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. *Br J Haematol* 2008;142:859–876. [PubMed: 18671700]
- ⁴ Balaban EP, Buchanan GR, Graham M, Frenkel EP. Diamond-Blackfan syndrome in adult patients. *Am J Med* 1985;78:533–538. [PubMed: 3919581]
- ⁵ Alter BP, Gaston T, Lipton JM. Lack of effect of corticosteroids in W/W^v and S1/S1^d mice: these strains are not a model for steroid-responsive Diamond-Blackfan anemia. *Eur J Haematol* 1993;50:275–278. [PubMed: 7686505]
- ⁶ Uechi T, Nakajima Y, Chakraborty A, Torihara H, Higa S, Kenmochi N. Deficiency of ribosomal protein S19 during early embryogenesis leads to reduction of erythrocytes in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mol Genet* 2008;17:3204–3211. [PubMed: 18653748]
- ⁷ Farrar JE, Nater M, Caywood E, et al. Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2008;112:1582–1592. [PubMed: 18535205]
- ⁸ Dianzani I, Loreni F. Diamond-Blackfan anemia: a ribosomal puzzle. *Haematologica* 2008;93:1601–1604. [PubMed: 18978295]
- ⁹ Ellis SR, Lipton JM. Diamond Blackfan anemia: a disorder of red blood cell development. *Curr Top Dev Biol* 2008;82:217–241. [PubMed: 18282522]
- ¹⁰ Jin A, Itahana K, O'Keefe K, Zhang Y. Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Mol Cell Biol* 2004;24:7669–7680. [PubMed: 15314174]
- ¹¹ Lam YW, Lamond AI, Mann M, Andersen JS. Analysis of nucleolar protein dynamics reveals the nuclear degradation of ribosomal proteins. *Curr Biol* 2007;17:749–760. [PubMed: 17446074]

-
- ¹² Flygare J, Aspesi A, Bailey JC, et al. Human RPS19, the gene mutated in Diamond-Blackfan anemia, encodes a ribosomal protein required for the maturation of 40S ribosomal subunits. *Blood* 2007;109:980–986. [PubMed: 16990592]
- ¹³ Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, Choessel V, O'Donohue M-F, Schneider H, Darras N, Hasman C, Sieff CA, Newburger PE, Ball SE, Niewiadomska E, Matysiak M, Zaucha JM, Glader B, Niemeyer C, Meerpohl JJ, Atsidaftos E, Lipton JM, Gleizes PE, Beggs AH. Ribosomal Protein L5 and L11 Mutations Are Associated with Cleft Palate and Abnormal Thumbs in Diamond-Blackfan Anemia Patients. *Am J Hum Genet.* 2008
- ¹⁴ Horn HF, Vousden KH. Cooperation between the ribosomal proteins L5 and L11 in the p53 pathway. *Oncogene* 2008;27:5774–5784. [PubMed: 18560357]
- ¹⁵ D.Pospisilova et al. Successful treatment of a Diamond-Blackfan anemia patient with amino acid leucine. *Haematologica* 2007; 92: (5)e66-e67
- ¹⁶ H. Lodish, J. Flygare, and S. Chou, “From stem cell to erythroblast: regulation of red cell production at multiple levels by multiple hormones,” *IUBMB Life*, vol. 62, no. 7, pp. 492–496, 2010.
- ¹⁷ A. Narla, S. Dutt, J. R. McAuley et al., “Dexamethasone and lenalidomide have distinct functional effects on erythropoiesis,” *Blood*, vol. 118, no. 8, pp. 2296–2304, 2011.
- ¹⁸ J. Flygare, V. R. Estrada, C. Shin, S. Gupta, and H. F. Lodish, “HIF1 α synergizes with glucocorticoids to promote BFU-E progenitor self-renewal,” *Blood*, vol. 117, no. 12, pp. 3435–3444, 2011.
- ¹⁹ O. Wessely, E. M. Deiner, H. Beug, and M. von Lindern, “The glucocorticoid receptor is a key regulator of the decision between self-renewal and differentiation in erythroid progenitors,” *The EMBO Journal*, vol. 16, no. 2, pp. 267–280, 1997.
- ²⁰ G. Ganguli, J. Back, S. Sengupta, and B. Wasyluk, “The p53 tumour suppressor inhibits glucocorticoid-induced proliferation of erythroid progenitors,” *EMBO Reports*, vol. 3, no. 6, pp.569–574, 2002.
- ²¹ Payne EM, Virgilio M, Narla A, et al. L-leucine improves the anemia and developmental defects associated with Diamond-Blackfan anemia and del(5q)MDS by activating the mTOR pathway. *Blood*. 2012;120(11):2214-2224.
- ²² Elspeth M. Payne, Maria Virgilio, Anupama Narla, Hong Sun, Michelle Levine, Barry H. et al. L-leucine improves the anemia and developmental defects associated with Diamond-Blackfan anemia and del(5q) MDS by activating the mTOR pathway. www.bloodjournal.org August 4, 2015.

-
- ²³ Ashley N. Kamimae-Lanning and Peter Kurre. L-leucine alleviates Diamond-Blackfan anemia. Kurre Oregon health & science university. Insideblood, report Sep 13,2012
- ²⁴ P. Jaako, J. Flygare, K. Olsson et al., “Mice with ribosomal protein S19 deficiency develop bone marrow failure and symptoms like patients with Diamond-Blackfan anemia,” *Blood*, vol. 118, no. 23, pp. 6087–6096 2011.
- ²⁵ Anupama Narla, Elspeth M. Payne, Nirmalee Abayasekara, Sater N. Hurst, David M. Raiser, et al. L-Leucine improves the anaemia in models of Diamond-Blackfan anaemia and the 5q- syndrome in a TP53-independent way. Short Report Jun 26,2015
- ²⁶ Galina S Ovsyannikova , Mikhail A. Maschan , Galina A. Novichkova , Nataliya S. Smetanina Preliminary data on L-Leucine therapy of DBA pediatric patients. (Abstract release date: May 21, 2015). EHA Learning Center. Ovsyannikova G. Jun 13, 2015; 100775
- ²⁷ Morisky DE, Green LW, Levine DM. Concurrent and predictive validity of a self-reported measure of medication adherence. *Med Care* 1986; 24: 67-74.
- ²⁸ Mutations in ribosomal protein S19 gene and diamond blackfan anemia: wide variations in phenotypic expression. Willing TN et al. *Blood*. 1999 Dec 15;94 (12):4294-306.
- ²⁹ Yates JW, Chalmer B, McKegney FP. Evaluation of patients with advanced cancer using the Karnofsky performance status. *Cancer*. 1980 Apr 15;45(8):2220-4.
- ³⁰ Bulbena A, Berrios GE, Fernández de Larrinoa P. *En Medición Clínica en Psiquiatría y Psicología*. Masson SA. Madrid 2000.
- ³¹ DSM-IV, Evaluación multiaxial: Escala de evaluación de la actividad global (EEAG) Eje IV.

10. Anexo I

Estimado paciente:

Usted está completando su tratamiento habitual con un suplemento alimenticio, con el fin de evaluar su satisfacción con el nuevo suplemento pautado en su tratamiento, la adherencia al mismo y su sensación de bienestar con respecto al mismo, le pedimos cumplimente el siguiente cuestionario.

Los datos en él recogidos son confidenciales, sujetos a secreto profesional y derecho a la intimidad del paciente.

La finalidad de la recogida de estos datos engloba la respuesta clínica, en forma de calidad de vida subjetiva y conformidad, a la nueva pauta de tratamiento, y el interés científico de respuesta al tratamiento, en forma de recogida de datos, los cuales serán extrapolados sin identificación asociada (de forma anónima, codificada con un número)

Esta misma encuesta será respondida nuevamente por usted una única vez más (dos veces en total) tras tres meses de toma del suplemento para poder evaluar posibles cambios percibidos de manera subjetiva, sin que ello suponga nuevas visitas ni más desplazamientos de los necesarios para el seguimiento analítico-clínico de su patología, ya estipulados.

Con su autorización usted comprende el objeto del cuestionario y autoriza a la recogida de los datos con fines científicos y adaptados al seguimiento de su tratamiento.

Firma del investigador

Firma del paciente

CUESTIONARIO MORISKY-GREEN: L- LEUCINA SUPLEMENTO ALIMENTARIO		
¿Se olvida alguna vez de tomar el medicamento?	SI	NO
¿Toma la medicación a la hora indicada?	SI	NO
Cuando se encuentra bien, ¿Deja alguna vez de tomar la medicación?	SI	NO
Si alguna vez se siente mal, ¿Deja de tomar la medicación?	SI	NO

Tabla 9. Cuestionario Morisky-Green²⁷

Estado de Actividad de Karnofsky	
100	Normal; sin quejas; sin evidencias de enfermedad.
90	Capaz de realizar las actividades normales; signos o síntomas sin importancia de la enfermedad.
80	Actividad normal con esfuerzo; algunos signos o síntomas de la enfermedad.
70	Se cuida de sí mismo, incapaz de realizar actividades normales o de realizar un trabajo activo.
60	Necesita asistencia ocasional, pero es capaz de cuidarse de la mayoría de necesidades personales.
50	Necesita asistencia considerable y cuidado médico frecuente.
40	Incapacitado gravemente; hospitalización indicada ;aunque la muerte no sea inminente .
30	Incapacitado gravemente; hospitalización necesaria; necesita tratamiento de soporte activo.
20	Muy enfermo; hospitalización necesaria; necesita tratamiento de soporte activo .
10	Moribundo, proceso mortal progresando rápidamente.

Tabla 10. Cuestionario actividad Karnofsky ²⁹

Escala de intensidad de Fatiga de Bulbena y Cols	
Mi motivación se reduce cuando estoy fatigado	1-2-3-4-5-6-7
El ejercicio me produce fatiga	1-2-3-4-5-6-7
Me fatigo fácilmente	1-2-3-4-5-6-7
La fatiga interfiere en mi funcionamiento físico	1-2-3-4-5-6-7
La fatiga me produce con frecuencia problemas	1-2-3-4-5-6-7
La fatiga me impide hacer ejercicio físico continuado	1-2-3-4-5-6-7
La fatiga interfiere en el desempeño de algunas obligaciones y responsabilidades	1-2-3-4-5-6-7
La fatiga es uno de mis síntomas que más me incapacitan	1-2-3-4-5-6-7
La fatiga interfiere en mi trabajo, familia o vida social	1-2-3-4-5-6-7

Tabla 11. Fatiga de Bulbena y Cols ³⁰

ESCALA DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLOBAL (EEAG)*

100 - 91	Actividad satisfactoria en una amplia gama de actividades, nunca parece superado/a por los problemas de la vida, es valorado/a por los demás a causa de sus abundantes cualidades positivas. Sin síntomas.
90 - 81	Síntomas ausentes o mínimos (por ej., ligera ansiedad antes de un examen), buena actividad en todas las áreas, interesado/a e implicado/a en una amplia gama de actividades, socialmente eficaz, generalmente satisfecho/a de su vida, sin más preocupaciones o problemas que los cotidianos (por ej., una discusión ocasional con miembros de la familia).
80 - 71	Si existen síntomas, son transitorios y constituyen reacciones esperables ante agentes estresantes psicosociales (por ej., dificultades para concentrarse tras una discusión familiar); solo existe una ligera alteración de la actividad social, laboral o escolar (por ej., descenso temporal del rendimiento escolar).
70 - 61	Algunos síntomas leves (por ej., humor depresivo e insomnio ligero) o alguna dificultad en la actividad social, laboral o escolar (por ej., hacer novillos ocasionalmente o robar algo en casa), pero en general funciona bastante bien, tiene algunas relaciones interpersonales significativas.
60 - 51	Síntomas moderados (por ej., afecto aplanado y lenguaje circunstancial, crisis de angustia ocasionales) o dificultades moderadas en la actividad social, laboral o escolar (por ej., pocos amigos, conflictos con compañeros de trabajo o escuela).
50 - 41	Síntomas graves (por ej., ideación suicida, rituales obsesivos graves, robos en tiendas) o cualquier alteración grave de la actividad social, laboral o escolar (por ej., sin amigos, incapaz de mantenerse en un empleo).
40 - 31	Una alteración de la verificación de la realidad o de la comunicación (por ej., el lenguaje es a veces ilógico, oscuro o irrelevante) o alteración importante en varias áreas como el trabajo escolar, las relaciones familiares, el juicio, el pensamiento o el estado de ánimo (por ej., un hombre depresivo evita a sus amigos, abandona la familia y es incapaz de trabajar; un niño golpea frecuentemente a niños más pequeños, es desafiante en casa y deja de acudir a la escuela).
30 - 21	La conducta está considerablemente influida por ideas delirantes o alucinaciones o existe una alteración grave de la comunicación o el juicio (por ej., a veces es incoherente, actúa de manera claramente inapropiada, preocupación suicida) o incapacidad para funcionar en casi todas las áreas (por ej., permanece en la cama todo el día; sin trabajo, vivienda o amigos).
20 - 11	Algún peligro de causar lesiones a otros o a sí mismo (por ej., intentos de suicidio sin una expectativa manifiesta de muerte; frecuentemente violento; excitación maníaca) u ocasionalmente deja de mantener la higiene personal mínima (por ej., con manchas de excrementos) o alteración importante de la comunicación (por ej., muy incoherente o mudo).
10 - 1	Peligro persistente de lesionar gravemente a otros o a sí mismo (por ej., violencia recurrente) o incapacidad persistente para mantener la higiene personal mínima o acto suicida grave con expectativa manifiesta de muerte.
0	Información inadecuada

Tabla 12. Escala evaluación actividad global³¹