

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



**FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE EL INJERTO EN EL
TRASPLANTE AUTÓLOGO DE PROGENITORES
HEMATOPOYÉTICOS DE SANGRE PERIFÉRICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Javier Pérez Calvo

Bajo la dirección de la Doctora:

Ana Villegas Martínez

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-2132-X



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

**FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE EL
INJERTO EN EL TRASPLANTE
AUTÓLOGO DE PROGENITORES
HEMATOPOYÉTICOS DE SANGRE
PERIFÉRICA**

Javier Pérez Calvo

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

**FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE EL
INJERTO EN EL TRASPLANTE AUTÓLOGO DE
PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DE
SANGRE PERIFÉRICA**

TESIS DOCTORAL

**Doctorando: Javier Pérez Calvo
Directora: Prof^a Ana Villegas Martínez**

Madrid, octubre de 2002

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

El Dr. Javier Pérez Calvo, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado: "FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE EL INJERTO EN EL TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DE SANGRE PERIFÉRICA".

El trabajo reúne las condiciones necesarias para ser defendido públicamente como tesis de investigación, para obtener el grado de doctor.

VºBº
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis

Fdo.: _____
(Fecha y firma)

Madrid, 4 de Octubre de 2002
Fdo.: PRE. A. VILLEGAS
(Fecha y firma)

DNI

DNI 137249

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

DR. D. JOSÉ L. ÁLVAREZ-SALA WALTHER, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

INFORMO: Que una vez examinado el Trabajo presentado por **D. Javier Pérez Calvo**, titulado: **FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE EL INJERTO EN EL TRASPLANTE AUTÓLOGO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DE SANGRE PERIFÉRICA**, dirigido por la Prof. Dª. Ana Villegas Martínez, este Departamento da su conformidad para que dicho trabajo sea leído y defendido en público con vistas a su aprobación como Tesis Doctoral.

Fecha reunión
Consejo Departamento

17 OCT. 2002

El Director del Departamento
DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Fdo.: José L. Álvarez-Sala Walther

Fdo.: _____
(Fecha y firma)

A mis padres

A Diana

A mis hijos

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial, al doctor Leopoldo Llorente, quien me inició en el conocimiento de las técnicas de aféresis y procesamiento celular y de quien partieron la idea de este trabajo y las mejores enseñanzas para su realización.

A las doctoras Covadonga García, Cristina Pérez, Lola Morales, Isabel Sáez y Susana Asenjo y al doctor Manolo Fariñas, quienes participaron en la recogida de datos y con quienes compartí tantos momentos de incertidumbre profesional durante la agitación de las bolsas.

A la doctora Ana Villegas, quien me ha ofrecido su dirección, sus consejos y su apoyo a lo largo de la elaboración de este trabajo.

A los doctores Joaquín Díaz Mediavilla, Rafa Martínez y Eloy del Potro y a la doctora Ana Álvarez, por iniciarme en el conocimiento de la hematología clínica y por desarrollar y mantener, gracias a su esfuerzo y su integridad, uno de los sistemas de atención más personalizados y meticulosos de los que un paciente se puede beneficiar.

A los doctores Miguel Martín, Antonio Casado y José Antonio López Martín, por su cooperación en la recogida de datos y por posibilitar este trabajo a través de una comunicación fluida entre oncólogos clínicos y hematólogos.

Al doctor Joaquín Rullás y a la doctora M^a Ángeles Figueredo, por la realización de los estudios de citometría de flujo.

Al doctor Eduardo Rocha y a mis compañeros del Servicio de Hematología de la Clínica Universitaria de Navarra, por la revisión crítica de este trabajo y por su estímulo y apoyo.

A la Universidad Complutense, donde recibí una formación que sólo después aprendí a valorar en su justa medida.

A la Universidad de Navarra, por el estímulo, la motivación y el orgullo que suponen trabajar para ella cada día.

A los Doctores Elpidio Calvo y Jesús Millán, por su ejemplo, su consejo y su cariño.

A mi familia, porque yo tuve el privilegio de aprender en casa el amor por la enseñanza.

Y por supuesto, mucho más que a nadie en este mundo, a Diana.

	Pag.
AGRADECIMIENTOS	5
.....	
ÍNDICE	6
.....	
RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS	9
SIGLAS Y ABREVIATURAS	12
.....	
INTRODUCCIÓN	14
.....	
1 - Evolución histórica del trasplante de progenitores hematopoyéticos y sus indicaciones	15
2 - Biología y caracterización de las células progenitoras.....	22
2.1- Conceptos de célula troncal y progenitor hematopoyético ...	22
2.2- Regulación de la hematopoyesis	23
2.3- Fenotipo y cuantificación de los PH	25
2.3.1 - Recuentos celulares	25
2.3.2 - Citometría de flujo	26
2.3.3 - Cultivos celulares	29
2.3.4 - Ensayos de repoblación <i>in vivo</i>	30
3 – Movilización	31
4 – Recolección celular	35
5 – Procesamiento y criopreservación celular	39
6 – Acondicionamiento	43
7 – Tiempo de injerto hematopoyético y morbilidad del trasplante	45
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	48
PACIENTES Y MÉTODOS	53

1- Pacientes	54
2- Evaluación previa y recogida de datos	56
3- Movilización	58
4- Recolección celular	59
5- Procesamiento, criopreservación y conservación celular	61
6- Acondicionamiento	63
7- Reinfusión celular	66
8- Manejo clínico del paciente y criterio transfusional	67
9- Evaluación analítica	69
9.1- Recuentos celulares	70
9.2- Cultivos de CFU-GM	71
9.3- Citometría de flujo	72
10- Análisis estadístico	74
10.1 – Variables	74
10.2 – Estadística descriptiva y estudio de normalidad	79
10.3 – Análisis de los factores que influyen sobre el injerto hematopoyético	80
10.4 – Análisis comparativo de los estimadores de calidad del producto celular	82
10.5 – Análisis del injerto en trasplantes con bajas cifras de PH	83
10.6 – Análisis predictivo de la recolección de PH	83
10.7 – Análisis de los factores que influyen sobre la movilización	84
10.8 – Programa informático	85
RESULTADOS	86
1- Características de los pacientes y los trasplantes	87
2- Estadística descriptiva de los resultados	90
2.1- Movilización	90
2.2- Recolección celular	93
2.3- Injerto hematopoyético	95

3- Factores que influyen sobre el injerto hematopoyético	98
3.1- Factores con influencia sobre la recuperación granulocítica	98
3.2 – Factores con influencia sobre la recuperación plaquetar ..	100
3.3 – Factores con influencia sobre el consumo de concentrados de hematíes	103
3.4 – Factores con influencia sobre las transfusiones de plaquetas administradas	105
4- Estudio comparativo de los estimadores de calidad del producto celular trasplantado	107
4.1 – Correlación entre los distintos estimadores	107
4.2 – Correlación con la cinética de injerto	111
4.3 – Injerto hematopoyético según el nivel de CD34+/33-	116
5- Injerto hematopoyético en pacientes trasplantados con bajas cantidades de células progenitoras	120
6 - Modelo predictivo de la recolección de progenitores hematopoyéticos	123
6.1 – Cálculo del modelo	123
6.2 – Validación del modelo	126
6.3 – Factores ajenos al resultado de la movilización	127
7- Factores que influyen sobre la movilización	129
DISCUSIÓN	131
1 – Características generales de la serie	132
2 – Resultado global de la movilización	134
3 – Factores que influyen sobre la precocidad del injerto	136
3.1 – Factores previos al trasplante	140
3.2 – Acondicionamiento y CSF postrasplante	143
3.3 – Estimadores del número de PH trasplantados	144
3.3.1 – Recuentos celulares	144
3.3.2 – CFU-GM	146
3.3.3 – Células CD34+ y CD34+/33-	147
4 – Injerto en pacientes trasplantados con bajas dosis de PH	151

ÍNDICE

9

5 – Predicción de la recolección de PH 153

6 – Factores que influyen sobre la movilización y recolección de PH 154

CONCLUSIONES **156**

.....

BIBLIOGRAFÍA **160**

.....

TABLAS	Pag.
<i>Tabla 1</i> Indicaciones de los trasplantes	54
<i>Tabla 2</i> Descripción de los regímenes de acondicionamiento	63
<i>Tabla 3</i> Pacientes según el diagnóstico	87
<i>Tabla 4</i> Pacientes según el régimen de acondicionamiento	88
<i>Tabla 5</i> Administración de factores de crecimiento postrasplante	88
<i>Tabla 6</i> Volumen de tratamiento recibido y extensión de la enfermedad	89
<i>Tabla 7</i> Número de PH recolectados por sesión y por volemia procesada	94
<i>Tabla 8</i> Factores con influencia sobre el injerto granulocítico en la serie global	99
<i>Tabla 9</i> Factores con influencia sobre el injerto granulocítico en el análisis estratificado por diagnósticos	100
<i>Tabla 10</i> Factores con influencia sobre el injerto plaquetar en la serie global	101
<i>Tabla 11</i> Factores con influencia sobre el injerto plaquetar en el análisis estratificado por diagnósticos	102
<i>Tabla 12</i> Factores con influencia sobre el consumo de hematíes en la serie global	104
<i>Tabla 13</i> Factores con influencia sobre las transfusiones de plaquetas en la serie global	106
<i>Tabla 14</i> Injerto y mortalidad según la dosis de células CD34+/33- ...	116
<i>Tabla 15</i> Cinética de injerto en tres grupos diferenciados por la dosis de células CD34+/33-	119
<i>Tabla 16</i> Factores significativos en la predicción del número de PH recolectados	124
<i>Tabla 17</i> Factores con influencia sobre la movilización de PH	129

<i>Tabla 18</i>	Estudios multivariantes de factores que influyen sobre el injerto que incluyen la subpoblación CD34+/33-	138
<i>Tabla 19</i>	Estudios multivariantes de factores que influyen sobre el injerto que no analizan la subpoblación CD34+/33-	139

FIGURAS

	Pag.	
<i>Fig. 1</i>	Referencia histórica a una célula troncal común circulante	17
<i>Fig. 2</i>	Evolución de la actividad de TPH en España	19
<i>Fig. 3</i>	Procesadores celulares de aféresis	37
<i>Fig. 4</i>	Opciones para la conservación de los PH criopreservados	41
<i>Fig. 5</i>	Efecto de la movilización sobre el recuento plaquetar	91
<i>Fig. 6</i>	Células CD34+/33- circulantes según el día de movilización	92
<i>Fig. 7</i>	Efecto de la movilización sobre el nivel de células CD34+/33-	93
<i>Fig. 8</i>	Número de aféresis requeridas para completar la recolección	94
<i>Fig. 9</i>	Células CD34+/33- recolectadas según el día de movilización	95
<i>Fig. 10</i>	Cinética actuarial de recuperación granulocítica en la serie global .	96
<i>Fig. 11</i>	Cinética actuarial de recuperación plaquetar en la serie global	97
<i>Fig. 12</i>	Relación entre la edad y el injerto plaquetar en los pacientes con mieloma	102
<i>Fig. 13 (A-J)</i>	Relación entre los distintos estimadores del número de PH trasplantados	108
<i>Fig. 14 (A-F)</i>	Relación entre los recuentos de CT y CMN y los tiempos de injerto granulocítico y plaquetar	111
<i>Fig. 15 (A-B)</i>	Relación entre los recuentos de células CD34+/33- y los tiempos de injerto granulocítico y plaquetar	114
<i>Fig. 16 (A-B)</i>	Relación entre los recuentos de CFU-GM y los tiempos de injerto granulocítico y plaquetar	115

<i>Fig. 17</i>	Cinética actuarial de recuperación granulocítica en tres grupos trasplantados con distinta dosis de células CD34+/33-	117
<i>Fig. 18</i>	Cinética actuarial de recuperación plaquetar en tres grupos trasplantados con distinta dosis de células CD34+/33-	118
<i>Fig. 19</i>	Cinética actuarial de recuperación granulocítica en los pacientes trasplantados con bajas dosis de PH	121
<i>Fig. 20</i>	Cinética actuarial de recuperación plaquetar en los pacientes trasplantados con bajas dosis de PH	122
<i>Fig. 21</i>	Relación entre el nivel de células CD34+/33- en SP el 5º día de movilización y el número de células recolectadas	126
<i>Fig. 22</i>	Comparación entre las cifras reales de células CD34+/33- recolectadas y las estimadas con el modelo de regresión	127

<i>Autom.</i>	Automático
<i>CB</i>	Carboplatino
<i>CFU-GM</i>	<i>Colony-forming units granulocyte/macrophage</i> (ing.: "unidad formadora de colonias granulocito-macrofágicas")
<i>CM</i>	Cáncer de mama
<i>CMN</i>	Células mononucleares
<i>CO</i>	Cáncer de ovario
<i>CP</i>	Cisplatino
<i>CPA</i>	Ciclofosfamida
<i>CSF</i>	<i>Colony stimulating factor</i> (ing.: "factor estimulante de colonias"): factor de crecimiento hematopoyético recombinante
<i>CT</i>	Células totales
<i>Enf.</i>	Enfermedad
<i>et ál.</i>	<i>et ál</i> (lat.: "y otros")
<i>Fig.</i>	Figura
<i>G-CSF</i>	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> (ing.: "factor estimulante de colonias granulocíticas")
<i>GM-CSF</i>	<i>Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor</i> (ing.: "factor estimulante de colonias granulocito-macrofágicas")
<i>IC</i>	Intervalo de confianza
<i>Ing.</i>	Inglés
<i>IV</i>	Intravenosa
<i>LAL</i>	Leucemia aguda linfoblástica
<i>Lat.</i>	Latín
<i>LAM</i>	Leucemia aguda mieloblástica
<i>Leuc.</i>	Leucocitos
<i>LH</i>	Linfoma de Hodgkin
<i>LMC</i>	Leucemia mieloide crónica
<i>LNH</i>	Linfoma no Hodgkin
<i>LUC</i>	<i>Large unstained cells</i> (ing.: "células grandes no teñidas"): células grandes peroxidasa-negativas del contador Technicon H1
<i>Med.</i>	Mediana
<i>MM</i>	Mieloma múltiple
<i>MO</i>	Medula ósea
<i>Mov.</i>	Movilización

<i>MTZ</i>	Mitoxantrone
<i>Pag.</i>	Página
<i>PH</i>	Progenitores hematopoyéticos
<i>Plq.</i>	Plaquetas
<i>QT</i>	Quimioterapia
<i>R²</i>	Coefficiente de determinación
<i>R²c</i>	Coefficiente de determinación corregido
<i>RR</i>	Riesgo relativo (" <i>relative hazard</i> " en el Test de los Riesgos Proporcionales de Cox)
<i>Rs</i>	Coefficiente de correlación por rangos de Spearman
<i>SP</i>	Sangre periférica
<i>TG</i>	Tumor de células germinales
<i>TMO</i>	Trasplante de medula ósea
<i>TPH</i>	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
<i>TT</i>	Tiotepa
<i>Tto</i>	Tratamiento
<i>VO</i>	Vía oral
<i>VP16</i>	Etopósido
<i>vs.</i>	<i>Versus</i> (lat.: "contra")

INTRODUCCIÓN

1 – EVOLUCIÓN HISTÓRICA DEL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS Y SUS INDICACIONES

Tras la finalización de la Segunda Guerra Mundial se despertó entre la comunidad científica un notable interés en torno a los efectos de la radiación ionizante sobre los organismos vivos¹. En el seno de este movimiento, Jacobson *et ál.*² describen cómo la protección del bazo es capaz de evitar la muerte de roedores sometidos a una irradiación a dosis letal. Poco después, Lorenz *et ál.*³ consiguen un efecto semejante en cobayas tras la infusión de medula ósea singénica, alogénica y xenogénica. En un primer momento, este fenómeno de protección frente a la radiación se atribuye a un factor humoral. Sin embargo, pronto se plantea una hipótesis alternativa, que responsabiliza de este efecto a un producto celular, por entonces sin definir⁴.

En los años siguientes se desarrolla una intensa actividad investigadora en torno a este fenómeno de protección radiológica y al trasplante alogénico de tejidos. Los hallazgos en roedores posibilitan las experiencias piloto del grupo de E.D.Thomas sobre modelos caninos, que bien se pueden considerar el antecedente inmediato del trasplante de medula ósea (TMO) en humanos⁵.

En 1957, Thomas *et ál.* publican el resultado de las primeras experiencias de TMO alogénico en humanos, en las que tan sólo se consiguió un injerto temporal en uno de los pacientes⁶. Al poco tiempo, Mathé *et ál.* publican su experiencia con la utilización de infusiones de medula ósea para tratar a un grupo de supervivientes de un accidente nuclear⁷. Sin embargo, un análisis posterior de esta serie permite afirmar que los injertos conseguidos se debieron probablemente a una reconstitución hematopoyética autóloga¹.

Estas experiencias pioneras precedieron al descubrimiento de los principios de la histocompatibilidad. Probablemente éste fue el factor determinante del escaso

éxito conseguido en estos años. La introducción, a finales de los 60, de los estudios de compatibilidad en la selección del donante supuso un avance fundamental que, de alguna manera, inaugura la "era moderna" del TMO^{1, 8-9}.

En 1959, el grupo de E.D. Thomas publicó el caso de una niña afecta de leucemia aguda que recibe un trasplante singénico de su hermana gemela¹⁰. Se produce un injerto precoz y satisfactorio, pero la paciente, acondicionada únicamente con irradiación corporal total, fallece de recaída al cabo de unos meses. El trasplante singénico aportó evidencias conceptuales de gran importancia para la comprensión de los mecanismos de histocompatibilidad y rechazo.

Desde estos primeros años de desarrollo del TMO, la posibilidad de utilizar la medula del propio paciente despierta un notable interés. El camino hacia el desarrollo de esta técnica se ve aclarado con la descripción de métodos de criopreservación que permiten mantener tejido hematopoyético medular viable durante largos periodos de tiempo^{11, 12}. De esta manera, Kurnick *et ál.*¹³ y McGovern *et ál.*¹⁴ describen las primeras experiencias de soporte hematopoyético con medula ósea autóloga tras una irradiación corporal total.

En general, el resultado clínico de estas primeras experiencias se vio fuertemente condicionado por varias limitaciones: la modesta eficacia de la irradiación corporal total por sí sola como tratamiento antileucémico, la condición clínica de los pacientes candidatos para estos estudios -generalmente con enfermedad refractaria o en recaída- la ausencia de un soporte transfusional adecuado y la inexistencia de antibióticos y antifúngicos de amplio espectro con un perfil de toxicidad adecuado.

La presencia de una *célula troncal común* circulante en sangre periférica ya fue intuita por A. Maximow en 1909^{15, 16} (Fig. 1). Este autor postuló que el linfocito actuaba como tal célula troncal, y que migraba a través de los tejidos hasta asentarse en un microambiente adecuado. Hubo que esperar más de 50 años para que se publicaran las primeras evidencias experimentales sobre la existencia de esta célula troncal o progenitora circulante; en 1962, Goodman y Hodgson son los

primeros en utilizar el término "blood stem cell" en la literatura científica¹⁷. El grupo de E.D.Thomas confirma posteriormente la posibilidad de aplicar estos hallazgos para el trasplante autólogo de sangre periférica en un modelo canino¹⁸.

**Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle
der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen
Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere.¹⁾**

Von

Prof. Dr. A. Maximow.

¹⁾ Demonstrationsvortrag, gehalten in der ausserordentlichen Sitzung der Berliner Hämatologischen Gesellschaft am 1. Juni 1909.

Figura 1 – Maximow postuló en una conferencia leída en 1909 en el Charité Hospital de Berlín que el linfocito actuaba como una *célula troncal común* y migraba a través de los tejidos hasta asentarse en un microambiente adecuado. Citado en *Korbling M, Flidner TM. History of Blood Stem Cell Transplants. En Gale RP, Juttner C, Henon P. Editores. Blood Stem Cell Transplants. Cambridge: Cambridge University Press; 1994. p. 9-19.*

Un paso decisivo para hacer viable la aplicación clínica en humanos de estos hallazgos vino dado por el desarrollo de separadores celulares capaces de recolectar grandes cantidades de células de sangre periférica¹⁹. Los primeros trasplantes de progenitores hematopoyéticos (TPH) autólogos realizados con células obtenidas de sangre periférica se llevan a cabo en el Hammersmith Hospital de Londres^{20, 21} y en el Johns Hopkins Hospital de Baltimore²². Sin embargo, la fecha en que esta técnica termina de asentarse definitivamente en la práctica clínica hay que situarla entre 1985 y 1986. En esos años, grupos de seis instituciones de distintas partes del mundo publican experiencias de TPH utilizando células de sangre periférica²³⁻²⁹.

Un factor esencial que condicionó el desarrollo de este tipo de TPH fue la descripción del fenómeno de *movilización*, por el cual el número de células progenitoras circulantes aumenta en determinadas circunstancias, como la recuperación hematopoyética tras una aplasia inducida por quimioterapia. Este fenómeno, así como sus posibles aplicaciones para recolectar grandes cantidades de

células mediante aféresis, fue descrito por primera vez por Richman *et ál.* en 1976³⁰. En los años siguientes se desarrollaron los procedimientos de movilización que hoy utilizamos, basados en el efecto descrito por estos autores y en la utilización de factores estimuladores de colonias hematopoyéticas³¹⁻³³.

La descripción de una técnica rápida y reproducible para cuantificar los progenitores hematopoyéticos (PH) mediante citometría de flujo supuso un avance fundamental en el desarrollo de estos tratamientos³⁴. Gracias a ella, el soporte hematopoyético de sangre periférica se puede concebir hoy como un tratamiento preciso, susceptible de dosificación.

Una vez introducidos en la práctica clínica estos avances, se produce la constatación definitiva de las ventajas del TPH autólogo de sangre periférica sobre el de medula ósea, fundamentalmente la reducción del tiempo de aplasia y la posibilidad de recoger el producto celular de forma ambulatoria y sin necesidad de anestesia³⁵. Como producto de ello, la sangre periférica se convierte paulatinamente durante la década de los 90 en la fuente preferida de PH para trasplante autólogo en la gran mayoría de los centros^{36, 37} (Fig. 2). En el caso del trasplante alogénico, el uso de la sangre periférica sigue asimismo una evolución creciente, aunque limitada por la posibilidad de una mayor incidencia de enfermedad injerto contra huésped crónica que con el uso de PH medulares³⁸.

Los resultados de numerosos estudios de fase II y de un número francamente limitado de ensayos prospectivos controlados han ido configurando el perfil de indicaciones generalmente aceptado hoy en día para el trasplante autólogo³⁹ (IN-275). Las leucemias agudas fueron la indicación más común en las primeras experiencias de TPH de SP^{24, 27-28}. La extrapolación de los resultados obtenidos con TMO ha conducido al asentamiento de su indicación como una alternativa de tratamiento estándar para la consolidación o intensificación de primera o sucesivas remisiones en la leucemia aguda mieloide (LAM)⁴⁰⁻⁴³. En la leucemia aguda linfoblástica (LAL) -con menos datos provenientes de estudios controlados que en el caso de la LAM- el trasplante autólogo tiene sus indicaciones más aceptadas en situaciones de alto riesgo o en recaídas como alternativa al TPH

alogénico. El trasplante autólogo en la leucemia mieloide crónica (LMC) presentó resultados prometedores en estudios preliminares, aunque hoy permanece como una alternativa de tratamiento no curativo probablemente capaz de prolongar la supervivencia en algunos casos. La creciente disponibilidad de donantes no emparentados para trasplante alogénico y la irrupción en el arsenal terapéutico del mesilato de imatinib han conducido a la revisión de todos los tratamientos vigentes contra la LMC⁴⁶⁻⁴⁸.

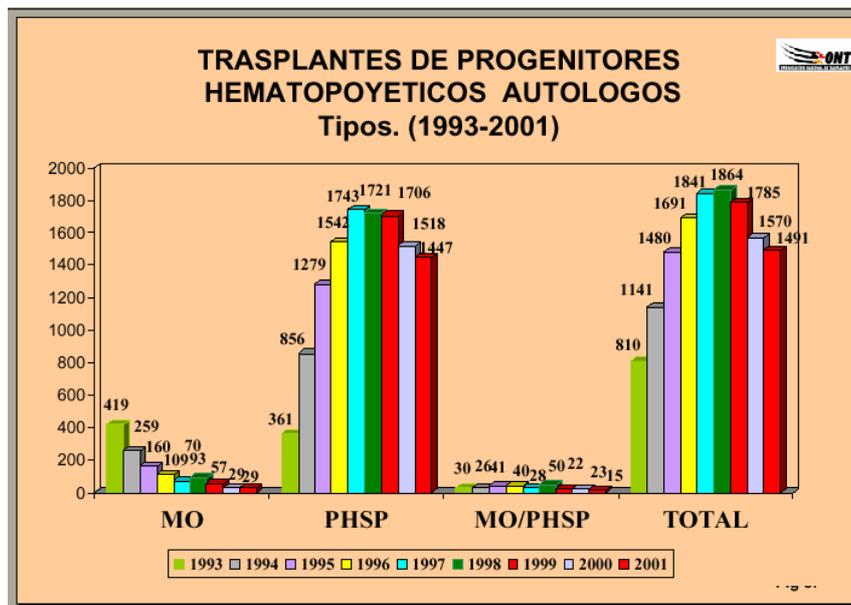


Figura 2 - Evolución del origen de los PH empleados para trasplante autólogo en España según los datos de la Organización Nacional de Trasplantes³⁷. Los PH de SP sustituyen progresivamente a los de MO. El número global de trasplantes aumenta de forma notable hasta 1998, en que comienza el declive de su utilización en el cáncer de mama. La evolución es similar a la producida en el conjunto de Europa^{36, 49}. MO: medula ósea. PHSP: progenitores hematopoyéticos de sangre periférica. Figura tomada de <http://www.msc.es/ont/esp/estadisticas/medula/tph.pdf> (acceso el 16-9-2002)

El Linfoma no Hodgkin (LNH) en segunda o sucesivas remisiones constituye hoy en día una de las indicaciones más establecidas de trasplante autólogo⁵⁰. Como parte del tratamiento de primera línea parece ofrecer una ventaja en pacientes de alto riesgo⁵¹. Otra indicación indiscutible para el TPH autólogo es El linfoma de

Hodgkin (LH) después del fallo de una quimioterapia de primera línea. Los buenos resultados de los tratamientos de primera línea en LH y la eficacia de las pautas de rescate hacen más controvertida su indicación en primera remisión. Hasta el momento no ha sido posible definir de entrada un grupo con un pronóstico suficientemente pobre como para justificar claramente un tratamiento primario más agresivo⁵². En el mieloma múltiple, los resultados del *Intergroupe Français du Myelome* vinieron a confirmar las primeras impresiones sobre el papel del TPH autólogo para prolongar la supervivencia⁵³. Aunque parece preferible su empleo en primera línea, también tiene un papel como parte del tratamiento de rescate tras quimioterapia⁵⁴.

Mención aparte merece la evolución del TPH aplicado al tratamiento de los tumores sólidos, muy especialmente al carcinoma de mama (CM). Una vez que el TPH autólogo era una técnica en uso para distintas neoplasias hematológicas diversos estudios de fase II que aplicaban el trasplante autólogo en CM de alto riesgo mostraron resultados superiores a los esperados según la experiencia histórica^{55, 56}. Unos resultados prometedores en un tumor de alta prevalencia condujeron a un aumento espectacular en la aplicación del TPH para el CM de alto riesgo durante la década de los noventa, hasta convertirse en su indicación más frecuente^{49, 57}. Entretanto, los estudios randomizados en distintos países presentaban importantes problemas para el reclutamiento de pacientes en las ramas de quimioterapia convencional. En los últimos años de la década, esta tendencia se invirtió bruscamente por la conjunción de varios factores: la no demostración de un claro beneficio en algunos estudios de fase III –que han sido criticados por su reducido tamaño o por el incorrecto diseño del brazo control-⁵⁸⁻⁶⁰, el descubrimiento de la manipulación de datos en dos estudios de un investigador conocido por sus resultados favorables al trasplante⁶¹, y la creciente disponibilidad de nuevas alternativas farmacológicas en el tratamiento del CM⁶², que han contribuido a llenar rápidamente el vacío creado en las ilusiones de clínicos, investigadores, pacientes e inversores en la industria farmacéutica.

En otros tumores sólidos quimiosensibles, salvo algunas excepciones como el neuroblastoma infantil o el tumor de células germinales en las que se usa de forma

estándar, el TPH autólogo permanece hoy en día como una alternativa experimental ante la falta de datos definitivos sobre su utilidad. Junto a ello, en los últimos años han surgido nuevas aplicaciones que se están investigando activamente, entre las que cabe destacar su uso en enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas⁶³.

Todos estos avances han contribuido a configurar el perfil que presenta el TPH en la actualidad. La evolución actual y futura de este procedimiento es preciso contemplarla en el marco de una nueva disciplina en incesante expansión: la *Terapia Celular*. En este terreno se acoplan con los procedimientos terapéuticos convencionales las nuevas formas de trasplante hemopoyético, con acondicionamientos no necesariamente únicos ni mieloablativos⁶⁴⁻⁶⁷, con técnicas de inmunoterapia adoptiva celular, tanto autóloga⁶⁸⁻⁶⁹ como alogénica^{64, 70}, con la posibilidad de obtener progenitores de distintos orígenes⁷¹⁻⁷⁴, de expandirlos *in vitro*^{75, 76} (IN-194, 195), de depurarlos de células tumorales contaminantes⁷⁷⁻⁷⁸, de modificarlos genéticamente⁷⁹, de asociarlos a células mesenquimales⁸⁰, de eludir con procedimientos técnicos las barreras del HLA⁸¹, etc. La *Terapia Celular* abarca el tratamiento con células progenitoras comprometidas de un número creciente de enfermedades extrahematopoyéticas⁸²⁻⁸⁵. Sin embargo, el hallazgo de la *plasticidad* o *versatilidad* de las células hematopoyéticas⁸⁶ y muy especialmente el reciente descubrimiento de las *Células Progenitoras Multipotenciales del Adulto* (MAPC) en la medula ósea humana^{87, 88} permiten asegurar que al menos una buena parte del inabarcable futuro de la terapia celular podrá seguir entendiéndose como la evolución natural del trasplante de medula ósea.

2 – BIOLOGÍA Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS

2.1 – Conceptos de célula troncal y progenitor hematopoyético

Las células hematopoyéticas evolucionan a través de una sucesión de estadios madurativos. Es posible establecer una división, de acuerdo con esta jerarquía madurativa, en tres tipos de poblaciones celulares: *células hematopoyéticas comprometidas*, *progenitores hematopoyéticos comprometidos* y *células troncales pluripotenciales* o "*stem cells*". El primer grupo constituye la mayor parte de la celularidad presente en la medula ósea y en la sangre periférica. Son células reconocibles morfológica y fenotípicamente como pertenecientes a una de las líneas de la hematopoyesis y su capacidad de replicación, en general, es bastante limitada. El grupo de los *progenitores hematopoyéticos comprometidos* acoge una población mucho más reducida, aproximadamente una de cada doscientas células en la medula ósea, precursoras de las anteriores, comprometidas de forma probablemente irreversible hacia alguna o algunas de las líneas y con una capacidad de replicación mayor, aunque limitada. Morfológicamente son células mononucleares, a menudo de aspecto blástico. Por último, las *células troncales pluripotenciales* son mucho menos abundantes; pertenecen a este grupo aproximadamente entre 1 célula de cada 20.000 y 1 célula de cada 100.000 en la medula ósea dependiendo de la técnica utilizada para su cuantificación⁸⁹⁻⁹¹.

Las células troncales se originan en los islotes sanguíneos del saco vitelino y en la región para-aórtica del embrión. A partir de ese momento, un reducido número de células troncales pluripotenciales mantienen la hematopoyesis durante toda la vida a través de su capacidad de auto perpetuación. Esta capacidad, cuyos mecanismos aun no han sido totalmente esclarecidos, está limitada probablemente en virtud del acortamiento telomérico⁸⁹.

Como se comentará a continuación, las células troncales son capaces de dar origen a colonias de progenitores comprometidos a largo plazo. Desde el punto de vista del trasplante, estas células se consideran esenciales para repoblar de forma estable la médula ósea tras un trasplante alogénico o tras un acondicionamiento con quimio o radioterapia a dosis mieloablativas. Sin embargo, probablemente no son capaces de evitar una aplasia prolongada en el receptor^{92, 93}. Debido a ello, el papel de los progenitores comprometidos es básico en el trasplante para conseguir un injerto precoz⁹⁰. Salvo en experimentos muy específicos, en el TPH se pretende utilizar un producto que contenga tanto células troncales como células progenitoras comprometidas. Por ello, en este trabajo se utiliza el término *progenitores hematopoyéticos (PH)* de forma general, para hacer referencia al producto celular que se trasplanta, asumiendo que incluye un abanico de subpoblaciones celulares distintas.

2.2 – Regulación de la hematopoyesis

La hematopoyesis del ser humano adulto asienta casi exclusivamente en las celdillas de la médula ósea. Además de la celularidad hematopoyética, en estos compartimentos asientan varios tipos de células estromales junto con una matriz extracelular, que contribuyen a conformar el denominado "*microambiente medular*". La interacción entre este microambiente y la celularidad hematopoyética es compleja y no ha sido esclarecida definitivamente. El microambiente contribuye a la regulación de la hematopoyesis a través de varios mecanismos, entre los que se encuentran la producción de factores de crecimiento (citoquinas) con actividad paracrina, el atrapamiento en el glicocáliz de citoquinas, producidas bien localmente o bien a distancia (actividad endocrina), la interacción mediante moléculas de adhesión y la interacción a través de factores de crecimiento expresados en la membrana celular. El estroma medular es importante para el cultivo *in vitro* de

células troncales. El TMO lleva aparejada la infusión de células estromales, mientras que el producto utilizado en el TPH de sangre periférica probablemente carezca de ellas. Aunque no se han publicado resultados de experimentos que aclaren definitivamente esta cuestión, de la experiencia clínica se desprende que probablemente la infusión de células estromales no desempeña un papel esencial en el injerto tras un TPH^{89, 94}.

El otro elemento fundamental para el control biológico de la hematopoyesis, además de la función del microambiente medular, es la compleja red de sustancias con actividad reguladora. Se trata en la mayor parte de los casos de glicoproteínas producidas por células de distinto tipo a lo largo del organismo. Su actividad, como hemos comentado, puede ser endocrina o paracrina, lo que hace muy complejo reproducir *in vitro* o farmacológicamente la actividad conjunta de estos factores. Hoy en día es posible disponer a escala experimental de casi todas estas sustancias o de potentes agonistas sintéticos de sus receptores. Algunas de estas sustancias están disponibles para su utilización farmacológica (*eritropoyetina*, *G-CSF*, *GM-CSF*), mientras que otros se encuentran en distintas fases precomerciales de ensayo clínico (*stem cell factor*, *interleukina 11*, *Pixy 321*, *daniplestim*, *trombopoyetina*, *ligando de FLT3*, etc). El *G-CSF* (*factor estimulante de colonias granulocíticas*) tiene especial relevancia en el terreno del TPH tanto para la movilización de células progenitoras como para el estímulo de la recuperación granulocítica. El *GM-CSF* (*factor estimulante de colonias granulocíticas y macrofágicas*) presenta una actividad equiparable en muchos aspectos, pero se utiliza de forma más restringida debido a sus efectos adversos.

2.3 – Fenotipo y cuantificación de los progenitores hematopoyéticos

Existe una serie de técnicas destinadas a cuantificar el número de PH presentes en un producto celular. La gama de técnicas disponibles comprende desde sencillos recuentos automáticos hasta ensayos de repoblación en modelos animales de elevado coste y gran complejidad. Al recorrer el espectro entre estos extremos se va comprometiendo la disponibilidad y utilidad clínica para ganar en precisión a la hora de detectar la población de células troncales pluripotenciales.

2.3.1 – Recuentos celulares

Los recuentos de células totales (CT) y de células mononucleares (CMN) constituyen la estimación más inmediata y sencilla del número de progenitores. Estas células no presentan características definidas que haga posible distinguirlas de las poblaciones linfoides y monocitarias con un sistema de citometría sin tinciones inmunológicas como el que utilizan los contadores celulares automáticos. Tanto el producto obtenido en una leucoaféresis de células mononucleares como un aspirado de medula ósea contienen poblaciones celulares más heterogéneas y complejas que una sangre periférica normal. El recuento diferencial de estos productos que puede realizar un contador automático sanguíneo ha de ser interpretado con cautela y revisado al microscopio. Los contadores que utilizan técnicas basadas en el tamaño celular para el recuento diferencial no son adecuados para cuantificar el porcentaje de CMN en un producto de aféresis. Los que utilizan tinciones de peroxidasa, como los Sistemas Technicon, permiten diferenciar esta población con mayor precisión, al excluir de forma efectiva las poblaciones granulocíticas. No existe acuerdo acerca de la forma más adecuada de cuantificar las CMN como estimador de calidad de un producto para trasplante. Un recuento automático con tinción de peroxidasa permite estimar las CMN por exclusión de todas las células con diferenciación granulocítica. Otros autores prefieren, mediante un recuento diferencial manual,

incluir en el concepto de CMN todas las células con núcleo único, incluyendo promielocitos y mielocitos. Las ventajas innegables de estos recuentos son su disponibilidad inmediata y su reproducibilidad. Además de ser un factor importante para el posterior estudio de citometría de flujo, estos recuentos son de utilidad para la toma de decisiones durante la recolección y en el procesamiento de los productos celulares. En el TMO los recuentos de CT y de CMN han sido y siguen siendo en muchos centros el parámetro fundamental que guía la recolección de progenitores medulares. No obstante, no pueden considerarse sino como un estimador muy indirecto del número de células troncales pluripotenciales.

2.3.2 – Citometría de flujo

La aplicación de la citometría de flujo con marcajes inmunológicos permite caracterizar de forma rápida y precisa poblaciones celulares. El antígeno CD34 es una glicofosfoproteína con dominios extracelulares e intra citoplasmáticos que se expresa en las células progenitoras hematopoyéticas desde el nivel de célula troncal hasta el estadio de progenitor comprometido en que pierde la capacidad de formar colonias *in vitro*⁹⁵. Además de los PH, en el adulto se ha demostrado su expresión en las células del endotelio vascular y en algunas células gliales. Es posible encontrar el CD34 en las células neoplásicas en el 40% de las leucemias agudas mieloblásticas, el 70% de las linfoblásticas B, el 5-20% de las linfoblásticas T, en algunos síndromes mielodisplásicos y mieloproliferativos crónicos y en tumores de la pared vascular⁹⁵. La citometría de flujo clasifica las poblaciones celulares en primera instancia de acuerdo a un parámetro proporcional al tamaño nuclear (*forward scatter*) y a otro que refleja la "complejidad citoplasmática", proporcional a la granularidad (*side scatter*). Los PH presentan un tamaño reducido o intermedio y un citoplasma agranular, características que permiten definir la ventana citométrica adecuada para el estudio del fenotipo antigénico. Este se lleva a cabo mediante anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos celulares y marcados con fluorescencia. Es posible utilizar combinaciones de varios anticuerpos con marcajes

de distintos colores, con objeto de estudiar simultáneamente la expresión de más de un antígeno en la misma célula.

La cuantificación de células que expresan el antígeno CD34 (CD34+) permite estimar el número de PH de un producto celular para trasplante de forma rápida y específica³⁴. Tomando como base la población de células CD34+ es posible definir distintas subpoblaciones de acuerdo a la expresión de otros antígenos de diferenciación. La célula troncal indiferenciada CD34+ no expresa o lo hace mínimamente marcadores precoces propios del compromiso hacia líneas de diferenciación, como el CD33 (línea mieloide), el CD7 (línea linfoide T), el CD10 (línea linfoide B), el CD71 (línea eritroide) o el CD41 (línea megacariocítica). Asimismo, expresa débilmente el CD90 (Thy-1) y no expresa el CD38 ni el HLA-DR (o lo hace muy débilmente)⁹⁶. Recientemente ha suscitado un enorme interés la descripción de una posible población de células troncales que no expresan el CD34 (CD34-)⁹⁷⁻¹⁰⁰; en este sentido, se ha propuesto que el CD34 podría ser un marcador de activación, y que su expresión podría ser reversible^{101, 102}. De cualquier manera, la citometría de flujo tiene un valor limitado a la hora de definir las poblaciones más inmaduras de células troncales, puesto que se ha demostrado cómo poblaciones con un fenotipo similar pueden presentar capacidades funcionales diferentes⁹⁶.

Las células CD34+ que no expresan el CD33 (CD34+/33-) constituyen una subpoblación enriquecida en progenitores indiferenciados que contiene casi todas las células con capacidad de iniciar cultivos a largo plazo, característica de las células troncales como se comenta más adelante¹⁰³⁻¹⁰⁵. Sin embargo, la falta de expresión del CD33 no es exclusiva de un tipo celular escaso y muy indiferenciado, sino que define un grupo amplio de progenitores que incluye también células comprometidas, capaces de iniciar cultivos a corto plazo y, probablemente, responsables del injerto inmediato. Por todo ello, *a priori* constituye una población muy interesante para su uso clínico como estimador de calidad del producto celular. El porcentaje de células CD34+ que no expresan el CD33 varía según el origen de la muestra (medula o aféresis de sangre periférica) y según el tipo de movilización empleada^{106, 107}. En general, dentro de las células CD34+ predomina la población CD34+/33-, especialmente en muestras de aféresis de sangre periférica de

pacientes movilizados con G-CSF y sin quimioterapia^{32, 106-107, 108-109}. Algunos estudios encuentran resultados diferentes, con una menor proporción de células CD34+/33-¹¹⁰⁻¹¹¹. Al menos parte de esta variabilidad de resultados puede deberse, además del origen de la muestra y la movilización, al hecho de que el antígeno CD33 se expresa de forma débil en estas células¹¹¹ o a la fuerte dependencia de la estrategia de elección de las ventanas citométricas o de los umbrales de detección^{106, 112}.

Entre los inconvenientes más importantes que presenta la citometría de flujo están las dificultades para conseguir precisión y reproducibilidad¹¹³. En este sentido, se han realizado notables esfuerzos para desarrollar técnicas que consigan hacer comparables los resultados de distintos laboratorios¹¹⁵⁻¹¹⁸. Las técnicas basadas en la selección de células según el *forward scatter* y el *side scatter* (Protocolo de Milán/Mulhouse o Protocolo Nórdico) han mostrado en estudios de intercomparación su reproducibilidad y su valor clínico como predictores del injerto en TPH autólogos de sangre periférica¹¹⁸. Otros autores defienden la utilización de técnicas de mayor complejidad, como el Protocolo del ISHAGE (*International Society for Hematotherapy and Graft Engineering*), que incluyan selecciones celulares basadas en el marcaje del antígeno panleucocitario CD45 o en tinciones de ácidos nucleicos o de viabilidad citométrica¹¹⁶⁻¹¹⁷. Hoy en día se han desarrollado técnicas semiautomáticas disponibles comercialmente de detección de células CD34+, sin que se haya solucionado definitivamente la controversia sobre cual debe constituir la técnica de referencia.

2.3.3 – Cultivos celulares

Las técnicas basadas en los cultivos celulares proporcionan información acerca de la capacidad clonogénica del producto sembrado. Conociendo la cantidad inicial de células es posible disponer de información cuantitativa, si bien en general esta información no es inmediata, sino que es preciso prolongar el cultivo durante semanas o incluso meses (cultivos a largo plazo). Un primer escalón lo constituyen los cultivos de progenitores formadores de colonias en medio semisólido. Estas técnicas se desarrollaron antes que las basadas en la citometría de flujo, y por tanto constituyeron la base biológica de la cuantificación de progenitores en los primeros años de desarrollo del TPH de sangre periférica¹¹⁹. Estos ensayos consisten en sembrar una cantidad de producto celular sobre un medio semisólido (agar, metilcelulosa o coágulos de plasma) enriquecido de distintas maneras (suero humano, sobrenadante de sangre placentaria, suero bovino fetal, citoquinas recombinantes) y cuantificar el número de colonias de cada tipo (identificables por su morfología o mediante tinciones inmunológicas) que se generan tras un periodo de incubación cercano a las dos semanas.

Estos cultivos reflejan la presencia de progenitores comprometidos hacia una o más líneas hematopoyéticas. Es posible detectar la presencia de unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E), macrofágicas (CFU-M), granulocíticas (CFU-G), megacariocíticas (CFU-Meg), granulocíticas y monocíticas (CFU-GM) o granulocíticas, monocíticas, eritroides y megacariocíticas (CFU-GEMM). Asimismo, existen técnicas para detectar progenitores con mayor potencial, como las "unidades formadoras de explosiones de colonias" o "burst forming units" (BFU-E, BFU-Meg) o las células de alto potencial proliferativo (HPP-CFC, HPP-BFU-Meg)⁹⁶. De todas ellas, las CFU-GM son las más utilizadas para estimar, en la clínica, el número de progenitores¹¹⁹. Los inconvenientes fundamentales para la aplicación práctica de esta técnica son la ausencia de resultados inmediatos y los problemas de precisión y reproducibilidad entre distintos laboratorios que se plantean^{113, 119-120}.

Los progenitores más inmaduros, incluyendo las células troncales indiferenciadas, son capaces de dar origen a cultivos celulares a largo plazo en presencia de estroma medular o de medio condicionado con estroma. Algunas técnicas aprovechan esta propiedad para detectar "*cobblestone area forming cells*" (CAFC; "*células formadoras de áreas de empedrado*")¹²¹ o "*long term culture initiating cells*" (LTCIC; "*células iniciadoras de cultivos a largo plazo*")¹²². Estas técnicas estiman de forma mucho más específica la presencia de células troncales. Sin embargo, se trata de métodos complejos, con varias fuentes de potencial imprecisión y variabilidad, y que tan solo deparan resultados a largo plazo (a partir de 5 semanas). Estas técnicas tienen un importante papel en investigación y en la validación de nuevos procedimientos, pero no en la estimación de la calidad de los productos celulares en la clínica.

2.3.4 – Ensayos de repoblación *in vivo*

Los estudios de repoblación celular en modelos animales constituyen la estimación experimental más precisa del número de células troncales. Consisten en transplantar un producto celular a animales inmunotolerantes y observar su capacidad de dar origen a una linfohematopoyesis plurilineal completa. Para ello se utilizan ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID; NOD/SCID)¹²³⁻¹²⁴ o incluso ovejas a las que se trasplanta durante la vida intrauterina^{98, 125}. Naturalmente, se trata de modelos experimentales complejos y costosos que no tienen lugar en la práctica clínica como estimadores de calidad de un producto para trasplante.

3 – MOVILIZACIÓN

Durante la vida embrionaria y fetal tiene lugar un intenso tráfico de PH a través de la sangre periférica. Este fenómeno es la continuación del movimiento migratorio que establece la actividad hematopoyética en el hígado fetal en las primeras semanas de desarrollo. En realidad, este tráfico de progenitores continua a lo largo de toda la vida, aunque de forma mucho más limitada, y es un fenómeno de gran importancia fisiológica para la homeostasis hematopoyética. Gracias a este mecanismo la medula ósea puede funcionar como un órgano único a pesar de tratarse de un tejido disperso por múltiples huesos a lo largo del organismo¹²⁶.

En el adulto el número de PH circulantes en situación basal es muy reducido. Brown *et ál.* encuentran una media de 4,3 células CD34+ por mm³ en una muestra de 47 donantes sanos¹²⁷. En pacientes previamente tratados con quimioterapia es la norma encontrar cifras aun menores. En determinadas circunstancias fisiológicas, como el ejercicio, se produce un aumento moderado de los niveles de progenitores circulantes¹²⁸. Sin embargo, desde el punto de vista del trasplante tienen mucha mayor trascendencia los aumentos que se producen durante la recuperación de una aplasia tras un ciclo de quimioterapia o tras la administración de determinadas citoquinas, por tratarse de incrementos importantes y reproducibles, y por tanto susceptibles de ser usados para obtener células para su uso terapéutico. El aumento del número de progenitores circulantes mediado por cualquier circunstancia recibe el nombre de *movilización*. En este apartado se hará hincapié en las movilizations inducidas farmacológicamente para su uso clínico.

Los mecanismos por los cuales se produce la movilización de progenitores aun no han sido definitivamente esclarecidos. En general, se acepta que los PH movilizados proceden de la medula ósea. Se ha demostrado que el tratamiento con G-CSF, la citoquina más utilizada para la movilización, altera los mecanismos de adhesión de las células progenitoras al microambiente medular, lo que podría facilitar su salida hacia el torrente sanguíneo¹²⁸. El fenómeno de movilización parece

estar más ligado a la liberación de los anclajes que fijan las células a la medula que a un aumento de la proliferación de los progenitores¹²⁹⁻¹³⁰.

El primer procedimiento de movilización que se explotó para su uso clínico fue el que libera células progenitoras a la sangre durante la recuperación de una aplasia postquimioterapia³¹. Una de las conclusiones de estas experiencias fue que los regímenes capaces de producir una neutropenia profunda (por debajo de $0,5 \times 10^9/l$) son los que tienen más posibilidades de generar una respuesta movilizadora suficiente¹³¹. Los inconvenientes fundamentales de este tipo de movilizaciones vienen dados por las complicaciones clínicas asociadas y por la variabilidad entre pacientes en la dinámica de recuperación, que hace difícilmente programable la recolección.

La asociación de factores de crecimiento recombinantes al mecanismo anterior, ya sea GM-CSF³², G-CSF¹³²⁻¹³³ o interleukina 3 asociada a GM-CSF¹³⁴, contribuyó a disminuir la duración de las aplasias, a hacer algo más reproducible la dinámica de la movilización y a conseguir movilizaciones más intensas. Hoy en día la movilización con quimioterapia no asociada a citoquinas no tiene lugar en la clínica. De las disponibles actualmente para uso clínico, la citoquina más usada en combinación con la quimioterapia es el G-CSF, por su mejor perfil de tolerancia. A pesar del apoyo a la recuperación que supone el factor de crecimiento, este tipo de movilización no está exento de los riesgos inherentes a una quimioterapia aplasante.

El efecto movilizador del G-CSF administrado en una situación de hematopoyesis basal se apreció por primera vez a finales de los años 80¹³⁵. Posteriormente, Sheridan *et ál.* estudiaron la aplicación práctica inmediata de este efecto³³. En este estudio, tras la administración de 12 µg/Kg al día de G-CSF se consiguió multiplicar por 58 la cifra basal absoluta de CFU-GM en la sangre periférica. Este efecto permitía recolectar un número suficiente de progenitores como para acelerar la dinámica de injerto respecto de controles históricos de TMO autólogo al ser administrados concomitantemente con la medula. A partir de este estudio, la movilización con G-CSF se extendió como una de las alternativas más

atractivas para el TPH. Sus ventajas más importantes residen en su buena tolerancia clínica y en la excelente reproducibilidad de la dinámica de movilización, gracias a la cual la recolección celular se puede programar de forma precisa. Además de ello, estudios posteriores han confirmado como este régimen es capaz de movilizar de forma potente tanto progenitores con un grado intermedio de diferenciación como progenitores inmaduros¹³⁶. En términos de células CD34+ totales, la movilización con G-CSF pasa por ser algo menos efectiva que la movilización con quimioterapia asociada a un factor de crecimiento¹³⁷⁻¹³⁸. Sin embargo, el perfil fenotípico de los progenitores movilizados con ambos procedimientos parece ser diferente, de tal manera que, aun obteniendo un mayor número de células CD34+, las diferencias en subpoblaciones como la CD34+/33- pueden no ser tan marcadas¹⁰⁶⁻¹⁰⁷.

Cualquiera que sea el procedimiento de movilización utilizado, existe una notable variabilidad en el resultado conseguido entre distintos pacientes. El espectro va desde pacientes en los cuales se consiguen movilizaciones excepcionales que multiplican por más de 100 su cifra basal de PH circulantes hasta aquellos en los que no se consiguen unos niveles mínimos que permitan recoger una cifra adecuada de PH tras repetidas aféresis por lo que se hace preciso intentar una nueva movilización. Los factores que determinan la eficacia de la movilización no han sido definitivamente definidos. En este sentido, es razonable investigar la influencia de distintos factores que pueden alterar la reserva medular del paciente, como tratamientos citostáticos previos, infiltración medular por el tumor, etc. Una movilización satisfactoria es un requisito importante para el éxito del trasplante. Es importante profundizar en el estudio de los factores que condicionan el resultado de la movilización y los datos clínicos que permiten predecirlo con cierta seguridad. El esclarecimiento de estos factores aportaría datos interesantes para la indicación clínica y la planificación del trasplante. Además de ello, esta información constituye un paso previo importante en el desarrollo de nuevas y más eficaces estrategias de movilización que ofrezcan una alternativa a pacientes que no respondan a las movilizaciones clásicas o que permitan recolecciones celulares más amplias con vistas a procedimientos de selección celular o *purging*, programas de terapia celular con soporte celular repetido, etc.

4 – RECOLECCIÓN CELULAR

La obtención de PH de sangre periférica a escala clínica para el trasplante se basa en la utilización de procesadores celulares de aféresis. Estos equipos son capaces de separar componentes sanguíneos a escala clínica, de forma automática y en un sistema cerrado. Un mecanismo de centrifugación permite discriminar los distintos componentes de la sangre de acuerdo a su densidad. Las características morfológicas y la densidad de los PH son similares a las de las células linfoides. Por otra parte, los PH representan un porcentaje mínimo de los leucocitos, casi siempre inferior al 1% incluso después de una movilización satisfactoria. Una separación basada simplemente en la centrifugación y adaptada para recoger grandes cantidades de células (procesando litros de sangre) no es capaz de diferenciar estos PH de la celularidad linfóide y monocítica. Por ello, los programas de recolección de PH de SP mediante leucoaféresis intentan recoger en realidad toda la población de células mononucleares, con la seguridad de que entre ellas se encuentran las células progenitoras.

Los procesadores más idóneos para la recolección de PH son los denominados *de flujo continuo*. Estos sistemas utilizan simultáneamente durante todo el proceso dos accesos venosos, uno para extraer la sangre del paciente o donante y otro para devolvérsela deplecionada del componente que está recogiendo. De esta manera se consigue que el volumen de sangre en el circuito extracorpóreo sea mínimo y que la devolución al paciente de sangre anticoagulada con quelantes del calcio sea paulatina, y con todo ello, una mejor tolerancia. En conjunto, en los procesadores de flujo continuo es posible procesar mayores volúmenes de sangre y conseguir un rendimiento mejor que con los de flujo discontinuo (equipos que utilizan una sola vía por la que extraen y devuelven la sangre alternativamente).

Entre los procesadores más utilizados para la recolección de PH se encuentra el Fenwall CS-3000 (Fig. 3-A). Este aparato realiza una separación en dos fases. La

sangre pasa a través de unas bolsas encajadas en unas cámaras rígidas con un relieve interno especial, y dentro de ellas se somete a la fuerza centrífuga. La primera cámara que atraviesa la sangre, llamada *cámara de separación*, aparta los hematíes y granulocitos, que son devueltos al paciente directamente, de los restantes componentes sanguíneos. Esta última fracción, denominada *plasma rico en componentes*, es bombeada hacia la segunda cámara, llamada *cámara de recolección* (Fig. 3-C). El relieve interno de esta cámara hace que, sometido este producto a la fuerza centrífuga, la parte más densa del plasma rico en componentes –las CMN– quede retenido en la bolsa mientras el plasma y la mayor parte de las plaquetas salen de ella para ser devueltos al paciente.

Otro procesador celular de uso muy extendido es el Cobe Spectra (Fig. 3-D). En el programa tradicional para recolección de CMN, las células son bombeadas en el interior de una cámara alargada que se encaja en la centrífuga formando una circunferencia que gira alrededor de su eje (Fig. 3-E). De esta manera, los distintos componentes de la sangre se ordenan dentro de esta cámara, disponiéndose las fracciones más densas en la periferia. Unas toberas de salida dispuestas en sentido radial surgen de distintos puntos del interior de la cámara para recoger los distintos componentes. La tobera que surge de la parte intermedia del interior de la cámara recogerá la fracción que ocupa la interfase entre el plasma y los hematíes: la delgada capa leucoplaquetar, que incluye las CMN.

El procesador celular Fresenius AS-104 también permite la recolección de PH de sangre periférica en un sistema de flujo continuo. La sangre es bombeada hacia una cámara en forma de elipsoide que se amplía en uno de sus extremos. Esta cámara gira permanentemente sobre su eje mientras la capa de CMN se va acumulando en este extremo. La bomba de recolección va recogiendo intermitentemente esta fracción en los momentos en que los sensores detectan la acumulación de una cantidad suficiente de células. Son las llamadas *fases de spillover o desbordamiento*.

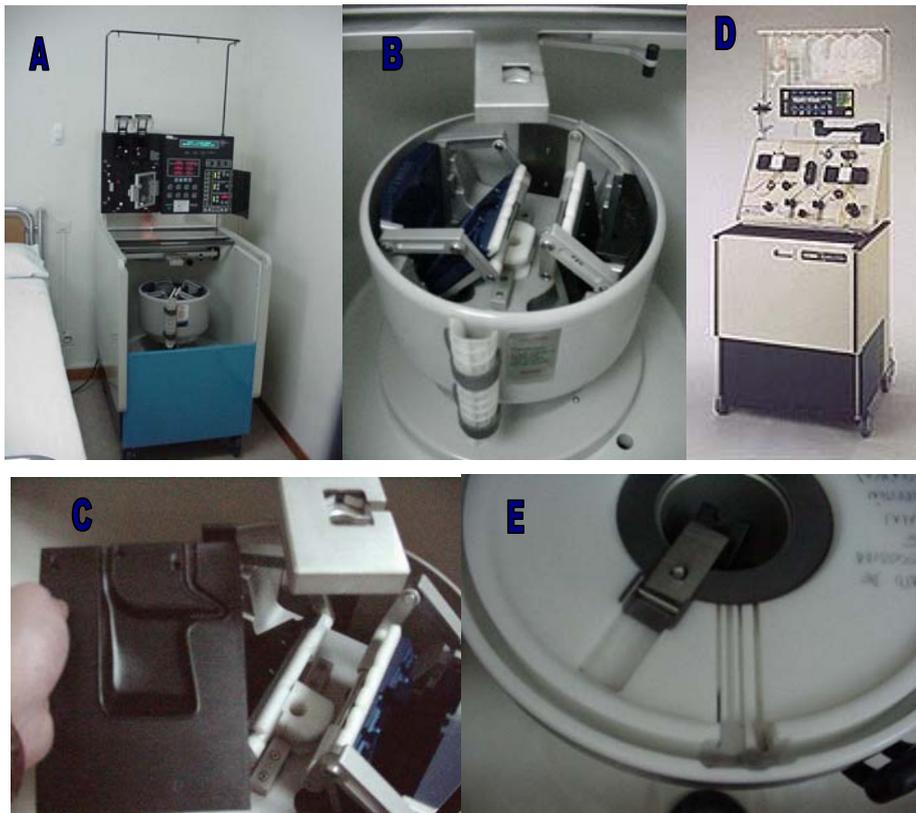


Figura 3 – Procesadores celulares de aféresis. El procesador Fenwall CS3000 (A) tiene un rotor (B) que contiene dos prensas enfrentadas para alojar sendas bolsas del sistema desechable. Las bolsas van aprisionadas entre unas cámaras rígidas con un relieve interno (C) que hace que las células queden en el interior de la bolsa y el sobrenadante salga. El procesador Cobe Spectra (D) tiene un rotor que aloja una cámara circunferencial en la que se hace la separación. Unas toberas de salida en sentido radial (E) parten de distintas alturas: la que surge de la periferia recoge los hematíes, la del centro la interfase leucoplaquetar y la de la zona más central el plasma.

La eficiencia de recolección de estos equipos se puede ver comprometida por distintas circunstancias. Las más habituales son las relacionadas con el acceso venoso. Salvo casos excepcionales, la recolección de PH para uso autólogo se debe llevar a cabo a través de accesos venosos de doble luz y de gran calibre. Los catéteres tunelizados de larga duración, tipo Hickman, presentan la ventaja de poder ser utilizados tanto para la recolección como para el trasplante posterior (reinfusión celular, infusión de medicación, toma de muestras, monitorización de

presión venosa, etc). Sin embargo, no son raros los problemas para extraer sangre del catéter (especialmente a flujos altos y continuos, como exigen las máquinas de aféresis) derivados de bandas de fibrina que comprimen su trayecto intravascular ejerciendo un efecto válvula, malposiciones, acodamientos, trombosis, etc. Además de las dificultades en el acceso venoso, en ocasiones hay problemas de tolerancia clínica, casi siempre derivados de episodios de hipocalcemia por efecto del citrato utilizado como anticoagulante. Por su parte, también puede haber problemas derivados de limitaciones de los sistemas de recolección (saturación de las cámaras de la CS-3000 en pacientes con gran leucocitosis, problemas para mantener estable la interfase en la Cobe Spectra cuando hay interrupciones del flujo, etc).

La recolección de PH persigue una población celular escasa, valiosa y efímera, puesto que se encuentra en la SP en virtud de un proceso de movilización inducido farmacológicamente y de duración limitada. Por ello, es de gran importancia desarrollar procedimientos que garanticen una recolección eficiente que permita aprovechar a fondo los días críticos de máxima movilización. El interés por el estudio de los factores que influyen la eficacia de la recolección se enmarca en esta búsqueda de eficacia y seguridad en un proceso de importancia capital para el éxito del trasplante.

5 – CRIOPRESERVACIÓN

El producto celular recolectado por aféresis debe mantenerse en unas condiciones que garanticen su viabilidad hasta el momento adecuado para su reinfusión. Aun en los casos en que el trasplante sigue inmediatamente a la recolección, este periodo de tiempo rara vez es inferior a una semana. Se trata del tiempo mínimo necesario para concluir la recolección, administrar el tratamiento de acondicionamiento -precedido de la hidratación y premedicación correspondientes- y respetar un periodo de entre uno y tres días para que el organismo metabolice y elimine completamente los citostáticos. Aunque se han ensayado otras alternativas^{67, 139}, el procedimiento más utilizado para conservar los PH durante este intervalo es la criopreservación.

Existen distintas teorías para explicar el daño celular inducido por frío. Cuando exponemos a temperaturas varios grados inferiores a 0° C un conjunto de células suspendidas en un medio líquido con solutos de características similares al plasma comienza la formación de hielo cristalino a partir de los llamados *centros de nucleación heterogénea*¹⁴⁰. Estos son conjuntos de moléculas agrupadas al azar a los cuales se van incorporando nuevas moléculas de agua a medida que se forma un cristal de hielo. Estos núcleos heterogéneos se forman fundamentalmente en el espacio extracelular; en el interior de la célula es más difícil su formación por el menor número de moléculas de agua libre y el efecto protector de la membrana. La formación de los cristales extracelulares va incorporando moléculas de agua y liberando los solutos, con lo que la osmolaridad aumenta progresivamente. El agua intracelular sale de la célula para compensar este efecto, lo que conduce a la deshidratación celular. Si el enfriamiento es suficientemente lento, este efecto puede conducir a la muerte celular por mecanismos no totalmente esclarecidos, pero en los que la deshidratación y la reducción del tamaño celular tienen un papel importante¹⁴¹⁻¹⁴².

Por otra parte, si la reducción de temperatura es rápida es posible evitar la salida de agua de la célula, pero a costa de que aumente la probabilidad de formación de núcleos heterogéneos y cristales de hielo intracelulares, que pueden contribuir a la destrucción celular mecánica¹⁴³. El cambio del estado líquido al sólido es otro momento crítico para la congelación celular, en el que se libera una importante cantidad de calor. Si es posible alcanzar temperaturas en torno a los 40°C bajo cero, el riesgo para la célula disminuye. Esta es la temperatura eutéctica de este sistema, a la cual se produce la *nucleación homogénea o vitrificación*, con formación de cristales amorfos, sin estructura cristalina, que no dañan las estructuras celulares¹⁴⁰.

Para conseguir alcanzar este estado evitando el daño celular por cualquiera de los mecanismos descritos es preciso recurrir a sustancias crioprotectoras. Se han utilizado distintos agentes capaces de lograr este efecto por diferentes mecanismos, pero el más utilizado desde hace años en la conservación de PH es el dimetil sulfóxido (DMSO). Varias propiedades de este compuesto contribuyen a proteger las células del daño inducido por frío. Por una parte, es un agente coligativo, capaz de ligar moléculas de agua. Los mecanismos de nucleación heterogénea descritos dependen de la presencia de agua libre, congelable. El DMSO reduce el agua disponible para los cristales, haciendo que permanezca en su sitio manteniendo el equilibrio osmótico. Por otro lado, la viscosidad del DMSO aumenta de forma importante al descender la temperatura, lo que dificulta la formación de una estructura cristalina y favorece la vitrificación. Junto a todo ello, el DMSO es una sustancia extraordinariamente liposoluble, lo que posibilita su rápida difusión al interior de la célula. En contrapartida, este agente tiene un efecto tóxico sobre la célula a temperatura ambiente, por lo que es preciso reducir al mínimo el tiempo de contacto con las células en estas condiciones. La dilución del DMSO libera calor, y su incorporación rápida a la suspensión celular puede producir un daño osmótico.

Para garantizar un descenso de la temperatura homogéneo y progresivo, a un ritmo adecuado (entre 1° y 3°C por minuto hasta alcanzar la temperatura de vitrificación) se utilizan cámaras de criopreservación programada. Estos dispositivos van suministrando el nitrógeno líquido necesario para descender la temperatura de

la cámara al ritmo previsto por un programa informático configurable según el tipo celular. En el momento del cambio de estado el sistema genera un enfriamiento suplementario para compensar la liberación de calor. Una vez superada la temperatura de vitrificación, el descenso se puede producir a un ritmo mayor. La congelación programada según este esquema en presencia de un 10% de DMSO es un procedimiento reproducible y seguro para garantizar la viabilidad de los PH¹⁴⁴. Tras la criopreservación programada, el almacenamiento a temperaturas inferiores a -120°C , ya sea en tanques de nitrógeno líquido o en ultracongeladores mecánicos (Fig. 4), permite la conservación de un producto celular útil para el trasplante durante largo tiempo¹⁴⁵. Algunos autores han sugerido que simplemente con temperaturas inferiores a -80°C es posible una conservación satisfactoria, al menos a corto plazo¹⁴⁶.



Figura 4 - Alternativas para la conservación de PH. Izquierda: ultracongelador mecánico capaz de mantener temperaturas por debajo de -120°C . Derecha: tanques de nitrógeno líquido, que mantienen -196°C en la fase líquida y entre -140°C y -196°C en la fase de gas.

En el momento preciso para su reinfusión es recomendable descongelar rápidamente el producto celular, lo que se suele llevar a cabo en un baño a 37°C en dos o tres minutos. Una descongelación más lenta supone un riesgo de recristalización intracelular, por la coexistencia en la bolsa de zonas parcialmente descongeladas con zonas congeladas aún a temperaturas muy bajas¹⁴⁰. Una vez descongelado, la práctica habitual es infundir el producto celular al paciente en el

curso de pocos minutos para evitar el efecto tóxico del DMSO a temperatura ambiente sobre las células.

6 - ACONDICIONAMIENTO

La capacidad terapéutica del TPH autólogo reside en el tratamiento con altas dosis de quimioterapia, asociada o no a radioterapia, durante el llamado *acondicionamiento*. En este caso, el trasplante de PH en sí no es sino la estrategia que permite administrar un régimen tan intensivo sin comprometer el funcionamiento del sistema hematopoyético a medio y largo plazo. En esto se diferencia del trasplante alogénico, en el que el efecto inmunoterápico conocido como *injerto contra tumor* desempeña un papel fundamental.

Los primeros regímenes utilizados para el trasplante autólogo coincidieron con los que se venían utilizando para el trasplante alogénico de medula ósea. El propio término "*acondicionamiento*" ya refleja el objetivo que se consideraba primordial en estos tratamientos: preparar la medula ósea para que pudiera injertar en ella el sistema hematopoyético del donante. Para ello se consideraba imprescindible erradicar la hematopoyesis del paciente mediante una quimioterapia completamente mieloablativa, además de profundamente inmunosupresora. Por añadidura, las indicaciones primordiales del trasplante eran las leucemias, con lo que el efecto mieloablativo resultaba terapéutico en sí mismo. Con estas premisas, las combinaciones de agentes alquilantes a dosis cercanas al máximo tolerable resultaron una de las alternativas preferidas por los clínicos. La combinación de busulfán y ciclofosfamida ha sido y sigue siendo uno de los regímenes más utilizados para el trasplante, tanto autólogo como alogénico de leucemias agudas y crónicas¹⁴⁷.

A medida que el TPH autólogo fue adquiriendo entidad propia y sus indicaciones se abrieron hacia otras neoplasias linfoides, fueron apareciendo regímenes de acondicionamiento con un carácter diferente. En su diseño prevaleció la idea de combinaciones de fármacos activos contra el tumor en cuestión y apropiados para su utilización a dosis altas. Con este enfoque comenzaron a

utilizarse regímenes como el BEAC¹⁴⁸ y el CBV¹⁴⁹ en linfomas. En el mieloma, el trasplante de PH posibilitó la escalada hasta dosis cercanas a las máximas tolerables del que históricamente ha sido el fármaco más importante para el tratamiento de esta neoplasia: el melfalán¹⁵⁰⁻¹⁵¹. Dosis de hasta 140 mg por m² de melfalán han sido utilizadas sin trasplante de PH. Sin embargo, utilizando el trasplante autólogo la morbilidad de este régimen disminuye considerablemente, y es posible escalar hasta dosis de 200 mg/m² e incluso mayores. Es una de las demostraciones más claras del sentido que va tomando el trasplante autólogo de PH: el recurso que permite tolerar un tratamiento eficaz. El tratamiento DICEP de alta dosis para carcinoma de ovario avanzado, administrado sin soporte con PH, tuvo en una serie una mortalidad del 12,5%, lo que conduce a un resultado global sin evidencia de beneficio frente a otros tratamientos menos tóxicos¹⁵². El mismo régimen administrado como acondicionamiento de un trasplante de PH presenta una morbi-mortalidad sensiblemente inferior¹⁵³.

En el carcinoma de mama, uno de los primeros regímenes utilizados, a raíz de los estudios de William Peters *et ál.*⁵⁵, fue el esquema STAMP-I (ciclofosfamida, cisplatino y BCNU), que se asoció con una toxicidad no desdeñable. Posteriormente, en un intento de buscar "*una alternativa más suave y más amable*"¹⁵⁴ se diseñó el régimen STAMP-V, a base de ciclofosfamida, tiotepa y carboplatino⁵⁶, que se ha convertido en el régimen más utilizado a nivel mundial para el trasplante autólogo en cáncer de mama.

A lo largo de la evolución del TPH autólogo se han ensayado un número realmente limitado de regímenes de acondicionamiento. El diseño de estos escasos regímenes pocas veces se ha basado en datos experimentales de escalada de dosis y un número aun menor ha sido probados en estudios prospectivos amplios de grupos cooperativos¹⁵⁵. Los estudios para el desarrollo de nuevos regímenes de acondicionamiento que exploren las posibilidades de nuevos fármacos¹⁵⁶ o de nuevos esquemas de administración^{66, 157} y su posterior ensayo en estudios controlados son esenciales para llegar a conocer y aprovechar a fondo todo el potencial del trasplante hematopoyético.

7 – TIEMPO DE INJERTO HEMATOPOYÉTICO Y MORBILIDAD DEL TRASPLANTE

La administración del régimen de acondicionamiento viene seguida unos días después de un periodo de aplasia profunda, reflejo de la intensa toxicidad de este tratamiento sobre los PH medulares. Las complicaciones derivadas de esta aplasia son el origen de la mayor parte de la morbilidad y mortalidad que sufren los pacientes sometidos a un TPH autólogo a corto y medio plazo^{40-41, 43, 53, 55-56, 158}.

Unas horas después de su reinfusión, los PH desaparecen de la SP y anidan en los territorios medulares, donde comienzan su proliferación y diferenciación¹⁵⁹⁻¹⁶⁰. Sin embargo, hasta unos días después los recuentos de sangre periférica no reflejan la aparición de los elementos celulares derivados de los progenitores transplantados. Aunque en un sentido biológico estricto los PH *injertan* unas horas después de su reinfusión, en un sentido clínico se entiende convencionalmente como *injerto hematopoyético* el momento en el que tenemos constancia por el hemograma de que el paciente recupera un número mínimo de granulocitos, leucocitos y plaquetas independientemente del soporte transfusional. Este momento supone sin duda el final del periodo más crítico del trasplante, y señala una disminución radical del riesgo de mortalidad infecciosa y hemorrágica.

El tratamiento con quimio-radioterapia a alta dosis, unido al efecto de los tratamientos anteriores y al efecto de la propia neoplasia del paciente, compromete casi todos los mecanismos del sistema inmunitario¹⁶¹⁻¹⁶². Sin embargo, de entre todos ellos, la profunda neutropenia es la que se asocia con un riesgo mayor a corto plazo. Las complicaciones infecciosas son responsables de la mayoría de los fallecimientos por causa tóxica en el postrasplante inmediato¹⁵⁸. Para prevenirlas se utilizan diversas estrategias en el manejo del paciente, como el ingreso en condiciones de aislamiento invertido, la antibioterapia profiláctica o el tratamiento antibiótico empírico precoz de amplio espectro. Sin embargo, hasta la consecución

del injerto hematopoyético el riesgo de una infección grave bacteriana o fúngica sigue siendo elevado. La disminución del tiempo de injerto es lo que se persigue con la administración de factores de crecimiento postrasplante¹⁶³. Sin embargo, su mecanismo de acción pasa por estimular la proliferación y diferenciación de los precursores granulocíticos, por lo que en ausencia de estos, su efecto no se hace evidente¹¹⁴.

Los regímenes de acondicionamiento provocan invariablemente una trombopenia muy severa que hace necesaria la administración de transfusiones de plaquetas profilácticas. A pesar de ellas, los episodios hemorrágicos constituyen otra de las complicaciones más frecuentes en el postrasplante inmediato, incluyendo hemorragias mayores responsables de parte de la mortalidad¹⁵⁸. Ciertas situaciones clínicas relativamente frecuentes durante la aplasia postrasplante, como las infecciones o las toxicidades de órganos como el hígado o la mucosa digestiva contribuyen al problema, al aumentar el consumo periférico de plaquetas, disminuir el rendimiento de las transfusiones, proporcionar focos de sangrado o comprometer otros mecanismos de la hemostasia.

Junto con las infecciones y las hemorragias, la toxicidad orgánica no hematológica de los citostáticos a alta dosis constituye otra fuente importante de morbilidad en el TPH. Algunas de estas manifestaciones tóxicas están igualmente ligadas por distintos mecanismos fisiopatológicos con la aplasia medular. Así, se ha demostrado la asociación del retraso en el injerto granulocítico y la intensidad de la mucositis¹⁶⁴. A su vez, una mucositis importante se asocia de forma independiente con la incidencia de infecciones y con la mortalidad relacionada con el trasplante¹⁶⁴.

Cassileth *et ál.* publicaron en el New England Journal of Medicine los resultados de un amplio estudio cooperativo que comparaba prospectivamente trasplante alogénico, trasplante autólogo y quimioterapia como tratamientos de intensificación en primera remisión completa de la LAM⁴³. La conclusión principal de este estudio fue la equivalencia entre los tres brazos en términos de supervivencia libre de enfermedad, lo que contrastaba con los resultados de otros estudios aleatorizados sobre el mismo tema, que encontraron mejores resultados en las

ramas de trasplante⁴⁰⁻⁴¹. Al contrario de los demás estudios, en el de Cassileth *et ál.* las medulas óseas utilizadas para el trasplante autólogo habían sido sometidas a depuración de células tumorales mediante incubación con perfosfamida. Como nosotros hicimos notar en una carta al director¹⁶⁵, este procedimiento de *purging* es tóxico para los PH, y se asocia con un retraso en el injerto incluso en neoplasias originadas fuera de la medula ósea como el carcinoma de mama (IN-317). En la rama de trasplante autólogo del estudio de Cassileth *et ál.* las medianas de tiempo hasta la recuperación granulocítica y plaquetar fueron respectivamente de 32 y 64 días, y la mortalidad en los 100 primeros días postrasplante fue del 14%, en la mayor parte de los casos debida a infección o hemorragia. Este trabajo es un claro ejemplo de cómo una maniobra que compromete la precocidad del injerto tiene sus consecuencias sobre el resultado clínico global del tratamiento.

El tiempo hasta el injerto hematopoyético es variable de unos pacientes a otros. En términos teóricos, múltiples factores podrían tener influencia sobre la precocidad con que un paciente se recupera tras el trasplante: el tipo de neoplasia, su extensión o no a la medula ósea, la situación de la enfermedad, el volumen de tratamiento previo con citostáticos o con radioterapia, el acondicionamiento que se utiliza, el número de PH que se trasplantan, el uso de factores de crecimiento postrasplante, etc. Todos esos parámetros y algunos más, medidos de distintas formas, están a disposición del clínico que debe tomar decisiones junto con el paciente sobre la indicación del trasplante, el momento idóneo para realizarlo o el riesgo que es conveniente asumir. Como hemos comentado, la precocidad con que cabe esperar que se produzca el injerto es trascendente para esas decisiones, y por tanto se hace necesario diferenciar el factor que influye de forma independiente de aquel que puede actuar simplemente como el producto intermedio de la influencia de otro o como una variable de confusión. El análisis de todos estos factores de forma conjunta, utilizando técnicas multivariantes y en una serie suficientemente amplia de trasplantes es una estrategia idónea para su adecuada jerarquización.

***HIPÓTESIS DE
TRABAJO Y OBJETIVOS***

La capacidad terapéutica del trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos reside en la administración de altas dosis de quimioterapia -en ocasiones asociada a radioterapia- durante el tratamiento de acondicionamiento. El trasplante celular permite que sea viable esta estrategia, pero no elimina completamente la toxicidad hematopoyética y extrahematopoyética que conlleva un tratamiento de tal magnitud. El trasplante hematopoyético se asocia, por tanto, con un riesgo de morbilidad y mortalidad no desdeñable, que en último término condiciona sus resultados finales. Sin duda, la toxicidad del trasplante tiene un peso elevado en la estimación del balance entre riesgo y beneficio a la hora de tomar una decisión clínica sobre la indicación de un trasplante. La principal causa intermedia de esta morbi-mortalidad hay que buscarla en la profunda aplasia medular yatrogénica que sigue al acondicionamiento. Este periodo de aplasia, sin duda el momento más crítico del trasplante autólogo, terminará gracias al injerto y desarrollo satisfactorio de las células progenitoras transplantadas, que se manifiesta por la recuperación hemoperiférica de las tres series. En consecuencia, la precocidad del injerto hematopoyético inmediato constituye un requisito imprescindible para el éxito global del trasplante.

El intervalo desde el trasplante autólogo de células de sangre periférica hasta la recuperación hematopoyética es variable. En principio, parece razonable que múltiples variables relacionadas con los pacientes o con el procedimiento empleado puedan tener influencia sobre el tiempo de injerto. Por una parte, son candidatos a trasplante pacientes con varias enfermedades neoplásicas de diferente biología y comportamiento clínico, en distintos estadios evolutivos, con distinta afectación medular y extramedular, habiendo recibido diferentes líneas terapéuticas con anterioridad y con un grado variable de respuesta a dichos tratamientos. Por otro lado, aspectos como el régimen de acondicionamiento utilizado y el manejo del paciente tras el trasplante podrían condicionar igualmente la recuperación hematopoyética. Por último, cabe esperar que la dosis de progenitores transplantados tenga una influencia notable sobre la precocidad con que este producto consigue restaurar la hematopoyesis. En una situación clínica real, todos estos factores están encima de la mesa, a disposición del clínico para que este incluya los más oportunos en su algoritmo a la hora de tomar decisiones sobre la indicación, metodología y

pronóstico del trasplante. Por tanto, es imprescindible definir cuales de estas variables influyen de forma significativa e independiente y cuales proporcionan información solapada o redundante, por actuar como productos intermediarios de la influencia de otra variable con más peso o por actuar como factores de confusión. Sólo el análisis multivariante conjunto de un número suficientemente amplio de parámetros puede contribuir a jerarquizar satisfactoriamente tantos factores de decisión.

Es posible estimar la dosis de progenitores hematopoyéticos mediante diversos procedimientos, con evidentes diferencias en cuanto a complejidad, disponibilidad, rapidez, reproducibilidad y coste. Sin embargo, junto a dichas características, el factor fundamental para decidir cual es la técnica más adecuada ha de ser su eficacia a la hora de predecir la precocidad del injerto hematopoyético. El recuento por citometría de flujo de la subpoblación CD34+/33- presenta unas características teóricas de gran interés para la evaluación de las células progenitoras relevantes en el trasplante. Este factor ha sido escasamente evaluado hasta la fecha en series clínicas. Su comparación con otros parámetros más utilizados en la estimación de la calidad del producto celular, como los recuentos automáticos y los de colonias hematopoyéticas puede proporcionar elementos de decisión útiles en la práctica clínica diaria.

Con relativa frecuencia se plantea el caso de un paciente candidato a un trasplante autólogo en el que no es posible recolectar una dosis celular por encima de los umbrales generalmente aceptados para considerarla adecuada. En esa situación se plantea la disyuntiva entre renunciar al trasplante y asumir el riesgo adicional que supone un trasplante con una dosis subóptima de células progenitoras. Sin embargo, la literatura contiene escasas referencias sobre la cinética de injerto en pacientes trasplantados con dosis bajas de células. El estudio de grupos de pacientes que por distintas circunstancias han sido trasplantados con dosis hoy consideradas escasas de progenitores hematopoyéticos debe contribuir a precisar el auténtico riesgo que se asumiría al llevar adelante este trasplante y con ello a tomar una decisión clínica correctamente fundamentada.

Durante el proceso de recolección celular mediante leucoaféresis es muy conveniente tener una referencia fiable y rápida acerca del número de progenitores hematopoyéticos que se espera obtener. Ello permite tomar decisiones sobre la continuidad del tratamiento movilizador, el número y la intensidad de las sesiones de aféresis, la necesidad de nuevas movilizaciones o incluso la viabilidad del trasplante. Si conseguimos disponer de una estimación consistente y precoz de la calidad del producto que se va a recolectar, el recuento definitivo de células progenitoras en este producto una vez extraído puede adquirir un carácter confirmatorio, sin que sea preciso retrasar la toma de decisiones.

La intensidad de la respuesta movilizadora es el factor que condiciona de manera más relevante la recolección celular. Algunos estudios publicados analizan la influencia de distintas variables clínicas sobre la movilización de células progenitoras. Sin embargo, la mayor parte de estos trabajos utiliza un régimen a base de quimioterapia asociada a factores de crecimiento. La movilización con G-CSF administrado en situación basal parece tener una menor eficacia en la movilización de células CD34+ totales, pero puede presentar ventajas evidentes, como su predictibilidad. Algunos trabajos afirman que este tipo de movilización permite la recolección de productos con una proporción mayor de células CD34+/33-, lo que sugiere que en términos absolutos la eficacia en la movilización de dicha subpoblación celular puede no ser inferior a la de los regímenes que incluyen quimioterapia. Los únicos datos disponibles sobre qué factores influyen en la movilización de células CD34+/33- con un régimen a base de G-CSF provienen del análisis univariante de pequeños grupos de pacientes y de la extrapolación de datos de pacientes movilizados con quimioterapia. La posible relevancia clínica de la movilización de células CD34+/33- para la precocidad del injerto justifica el interés del estudio de las variables que influyen de forma independiente sobre ella en una serie suficientemente amplia.

En definitiva, para el desarrollo de las cuestiones planteadas nos hemos propuesto los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar las variables clínicas y analíticas que influyen de forma independiente sobre la precocidad del injerto hematopoyético inmediato en pacientes con distintos tipos de neoplasias sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica, utilizando como indicadores directos los tiempos hasta la recuperación granulocítica y plaquetar y como estimadores indirectos los consumos transfusionales de plaquetas y hemáties.
2. Analizar comparativamente la eficacia de distintos parámetros analíticos empleados para estimar el número de células progenitoras trasplantadas utilizando como objetivo de referencia su capacidad para predecir la precocidad del injerto hematopoyético. Estudiar de forma particular la relevancia clínica de la cuantificación de células CD34+/33- en el producto celular trasplantado.
3. Estudiar las características del injerto hematopoyético en un subgrupo de pacientes trasplantados con una dosis escasa de progenitores.
4. Construir un modelo de regresión capaz de estimar el número de células progenitoras que será posible recolectar a partir de parámetros clínicos y analíticos disponibles con antelación.
5. Estudiar las variables que influyen de forma independiente sobre la movilización de células CD34+/33- con un régimen a base de G-CSF administrado en situación basal.

PACIENTES Y MÉTODOS

1 – PACIENTES

El trabajo analiza todos los trasplantes de progenitores hematopoyéticos (TPH) autólogos de sangre periférica (SP) llevados a cabo en los Servicios de Hematología y Hemoterapia y Oncología Médica del Hospital Clínico de San Carlos de Madrid entre febrero de 1992 –fecha de inicio del primer programa de TPH de SP- y marzo de 1996.

La mayor parte de los pacientes fueron incluidos en protocolos terapéuticos que incorporaban un tratamiento de consolidación con altas dosis de quimioterapia y TPH. El trabajo incluye asimismo algunos trasplantes realizados en pacientes de forma electiva ante situaciones clínicas individuales en que se consideró la mejor alternativa posible. la Tabla 1 recoge las situaciones clínicas en las que se indicaron los trasplantes.

Cáncer de mama	Metastático (estadio IV) Localmente avanzado (4 o más ganglios afectados) Inflamatorio
Linfoma no Hodgkin	Segunda o sucesiva remisión Primera remisión completa en linfoma folicular
Linfoma de Hodgkin	Segunda o sucesiva remisión
Mieloma múltiple	Primera remisión Segunda o sucesiva remisión
Cáncer de Ovario	Estadios III y IV de la FIGO Enfermedad recurrente quimiosensible
Leucemia aguda mieloide	Segunda o sucesiva remisión completa
Leucemia aguda linfoide	Segunda o sucesiva remisión completa
Leucemia mieloide crónica	Segunda fase crónica
Otros: tumores de células germinales (carcinoma embrionario mediastínico, tumor de Atskin, tumor de testículo no seminomatoso), sarcoma de Ewing, sarcoma uterino.	

Tabla 1 – Diagnósticos y situaciones clínicas en las que se indicaron los trasplantes.

Se consideraron aptos para el trasplante los pacientes menores de 70 años (60 años en los protocolos para tumores sólidos) que no presentaran una cardiopatía, insuficiencia hepática, insuficiencia renal o insuficiencia respiratoria. La presencia de metástasis cerebrales se consideró un criterio de exclusión.

El objeto primordial del TPH en estos programas fue el tratamiento de la enfermedad mínima residual. De acuerdo con ello, para su inclusión se requirió que los pacientes se encontraran en situación de enfermedad mínima: remisión completa o buena remisión parcial en los pacientes tratados con quimioterapia de inducción y situación de "no evidencia de enfermedad" en los pacientes tratados quirúrgicamente. Este criterio permite asimismo comprobar la quimiosensibilidad del tumor antes del trasplante.

2 – EVALUACIÓN PREVIA Y RECOGIDA DE DATOS

La decisión individual acerca de la indicación del trasplante fue adoptada por los responsables clínicos de los Servicios de Hematología y Oncología. Estos fueron los responsables de informar al paciente acerca del trasplante y sus alternativas y de solicitar su consentimiento específico. La información acerca de la movilización y recolección de PH fue facilitada directamente por los hematólogos responsables de estas actividades.

Antes del trasplante cada paciente fue sometido a una evaluación completa del estatus de su enfermedad y de los distintos sistemas orgánicos. Dependiendo del diagnóstico primario del paciente y de su estadiaje inicial, estas evaluaciones incluyeron un hemograma, pruebas de coagulación, bioquímica general, pruebas de función hepática, proteínas totales y proteinograma (con inmunoelectroforesis y cuantificación de la banda monoclonal en su caso), inmunoglobulinas, sistemático de orina y sedimento (con cuantificación e inmunoelectroforesis de proteínas y excreción de cadenas ligeras en 24 horas en su caso), aclaramiento de creatinina, tomografía computarizada (TC) tóraco-abdominal (en linfomas también cervical), gammagrafía ósea (tumores sólidos), serie ósea metastásica (gammapatías monoclonales), espirometría, test de difusión de CO, ecocardiograma con medición de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y aspirado con o sin biopsia de medula ósea.

Antes de comenzar el régimen de movilización se implantó a cada paciente un catéter central tunelizado tipo Hickman 12.0 Fr de doble luz, en localización subclavia. La colocación del catéter se realizó en una unidad de radiología vascular intervencionista o en quirófano por un cirujano. Cada vía del catéter se selló con heparina diluida con una periodicidad no superior a 48 horas.

Los datos clínicos pretrasplante fueron recogidos con anterioridad al trasplante a partir de la historia clínica. Los datos de calidad del producto

hematopoyético transplantado, características de la recolección e injerto hematopoyético fueron obtenidos prospectivamente en la unidad de aféresis y procesamiento del Servicio de Hematología y en las unidades clínicas de Hematología y Oncología Médica.

3 – MOVILIZACIÓN

Para la movilización se utilizó un régimen homogéneo en todos los pacientes, basado en una modificación del propuesto por Sheridan *et ál.* (IN-6). A partir de una situación de hematopoyesis razonablemente basal –al menos un mes después del último ciclo de quimioterapia- se administró G-CSF recombinante no glicosilado (filgrastim; Neupogen, Lab. Amgen, Barcelona; Granulokine, Lab. Pensa, Barcelona) a una dosis de 12 µg/kg al día por vía subcutánea en una administración única a mediodía hasta el día de la última leucoaféresis. Todo el procedimiento de movilización y recolección se llevó a cabo de forma ambulatoria, salvo en pacientes que debieran permanecer ingresados por otras causas.

Para aquellos casos en que tras una movilización no fuera posible recolectar un número suficiente de PH para el trasplante se planificó una segunda movilización similar a la primera o con doble dosis de filgrastim. En estos casos, tan solo se han analizado los datos de movilización de la primera, si bien para el análisis del injerto se ha contabilizado como producto infundido el total utilizado en el trasplante.

4 – RECOLECCIÓN CELULAR

La recolección celular se inició el quinto día desde el comienzo de la movilización, salvo en una serie corta de pacientes consecutivos en los que comenzó el cuarto día. Se realizó una sesión diaria de leucoaféresis hasta recolectar un número suficiente de PH para el trasplante o bien hasta tener constancia de que la movilización se encontrara en fase regresiva y la cifra de PH en sangre periférica no aconsejaba realizar más por el bajo rendimiento previsible. El número mínimo de leucoaféresis programadas por movilización fue de dos (salvo en un caso en que se realizó una única sesión) con objeto de evitar el riesgo de contaminación o deterioro accidental de un producto único.

El criterio para considerar un producto como suficiente e interrumpir las recolecciones se modificó con el tiempo como resultado de análisis interinos de la propia serie. En un primer momento, se utilizó el criterio de intentar conseguir una cifra superior a 4×10^8 /kg células mononucleares (CMN) con más de 4×10^4 /kg unidades formadoras de colonias granulocítico-monocíticas (CFU-GM). Tras un primer análisis preliminar de la serie, se adoptó como criterio el intentar alcanzar $1,5 \times 10^6$ /kg células CD34+/33- medidas por citometría de flujo. Un segundo análisis de nuestra serie¹⁶⁷ y la comunicación de los primeros resultados de otros grupos trabajando con dicha subpoblación¹⁶⁸ nos llevaron a rebajar esta cifra hasta $1,2 \times 10^6$ /kg células CD34+/33-.

Las leucoaféresis se llevaron a cabo en procesadores celulares de flujo continuo, procesando entre dos y tres volemias de sangre total (excluyendo el anticoagulante) por sesión. Se utilizó ACD-A como único anticoagulante. A lo largo de la serie se utilizaron procesadores celulares Fenwall CS-3000 plus, Cobe Spectra y Fresenius AS-104. El procesador CS-3000 plus se utilizó con flujo de entrada entre 40 y 60 ml por minuto, con la cámara SVCC de 50 ml y con dos programas diferentes, uno que fijaba el umbral del detector de interfase en 115 y la velocidad de la centrifuga en 1400 revoluciones por minuto y otro con umbral en 150 y

centrífuga a 1600 revoluciones. En el procesador Cobe Spectra se utilizó con la versión 4 de software con el programa convencional de recolección de CMN, y una proporción de anticoagulante entre 1:12 y 1:14. El procesador AS-104 se utilizó con volúmenes de *buffy-coat* y de *spillover* entre 5 y 7 ml. Como se ha comentado anteriormente, la recolección celular se llevó a cabo de forma ambulatoria, salvo ingreso del paciente por otra causa.

El *rendimiento en la recolección de CD34+/CD33-* o simplemente "*rendimiento*" de una leucoaféresis lo definimos como la relación entre el número de células CD34+/CD33- recolectadas en una sesión y el número de estas células presentes en la sangre periférica del paciente (en una volemia) antes de dicha sesión, expresado en tanto por ciento. Para su cálculo se utilizó la siguiente fórmula:

		Nº de CD34+/CD33- recolectadas		
Rendimiento	=	—————		x 100
		CD34+/CD33- en SP previa	x volemia	

En los primeros pacientes de la serie se realizó tras la movilización una extracción de PH de medula ósea y se almacenó como producto de reserva para el caso de un eventual fallo de injerto.

5 – PROCESAMIENTO, CRIOPRESERVACIÓN Y CONSERVACIÓN CELULAR

Los productos de aféresis fueron procesados y criopreservados inmediatamente en la mayor parte de los casos. Cuando no fue posible procesarlos inmediatamente se almacenaron a 4° C y fueron criopreservados al día siguiente, antes de cumplirse 24 horas de su obtención.

Para su criopreservación los productos fueron diluidos con plasma autólogo recolectado durante la sesión de leucoaféresis para ajustarlos a una concentración final de entre 50 y 70 x 10⁹/l células totales. Tras esta dilución fueron repartidos en bolsas de criopreservación Gambro DF-200 o Baxter Cryocyte 9957 y refrigerados en hielo picado. A este producto se añadió lentamente y con agitación suave una solución refrigerada de dimetil sulfóxido (DMSO) al 20% en medio 199. Las bolsas así preparadas, con un volumen máximo de 200 ml cada una y una concentración final de DMSO del 10%, se mantuvieron por debajo de 4° C hasta su criopreservación.

Los productos celulares se sometieron a criopreservación programada en un sistema Cryoson BV-10. Tras una rampa inicial de atemperación de 20 minutos de duración, el sistema iniciaba el descenso programado de temperatura con un objetivo para el termopar de la muestra de 1° C por minuto. En el momento del cambio de estado el sistema aumentaba el suministro de nitrógeno líquido durante unos minutos para compensar la liberación de calor. Tras el cambio de estado se programó un ritmo de descenso de 1° C por minuto hasta los -40° C seguido de 2° C por minuto hasta -60° C y de 5° C por minuto hasta -100° C. Alcanzada esa temperatura, las bolsas fueron introducidas para su almacenamiento en la fase líquida de un tanque de nitrógeno o en un congelador mecánico de -140° C.

Los productos conservados a -140° C fueron utilizados antes de 3 meses desde su criopreservación. Los almacenados en nitrógeno líquido (a -196°) también

se emplearon en su mayor parte en el curso de pocas semanas, si bien en caso necesario se consideró apropiada su conservación durante más de un año.

6 – ACONDICIONAMIENTO

Una vez comprobado que el paciente reunía todos los requisitos mencionados para la indicación del trasplante y que el producto recolectado se consideraba suficiente se planeaba el ingreso para el tratamiento de acondicionamiento. La tabla 2 resume los regímenes de acondicionamiento utilizados. Como es habitual, se contabiliza como "día cero" el de la infusión del producto celular.

RÉGIMEN	DIAG	FÁRMACOS	REF	
STAMP-V	CM	CPA 6 g/m ² + TT 500 mg/m ² + CB 800 mg/m ²	56	
ESCALADA DE DOSIS	Nivel 1	CM	CPA 6 g/m ² + TT 500 mg/m ² + CB 800 mg/m ² + MTZ 20 mg/m ²	157
	2	CM	CPA 6 g/m ² + TT 500 mg/m ² + CB 1000 mg/m ² + MTZ 30 mg/m ²	
	3	CM	CPA 6 g/m ² + TT 500 mg/m ² + CB 1200 mg/m ² + MTZ 40 mg/m ²	
	4	CM	CPA 6 g/m ² + TT 500 mg/m ² + CB 1400 mg/m ² + MTZ 50 mg/m ²	
	5	CM	CPA 6 g/m ² + TT 500 mg/m ² + CB 1600 mg/m ² + MTZ 45 mg/m ²	
	6	CM	CPA 6 g/m ² + TT 500 mg/m ² + CB 1400 mg/m ² + MTZ 40 mg/m ²	
BEAC	LNH	BCNU 300 mg/m ² + VP16 800 mg/m ² + ARAC 800 mg/m ² + CPA 140 mg/kg	148	
CBV	LH	BCNU 300 mg/m ² + VP16 600 mg/m ² + CPA 6 g/m ²	149	
BuCy	MM, LA, LMC	BU 16 mg/kg + CPA 120 mg/kg	147	
Melfalán	MM	Melfalán 200 mg/m ²	150	
HD-DICEP	CO, TG	CP 150 mg/m ² + VP16 900 mg/m ² + CP 4,5 g/m ²	153	

Tabla 2 Regímenes de acondicionamiento utilizados. Abreviaturas: Diag.: diagnóstico; Ref.: referencia; CM: cáncer de mama; LNH: linfoma no Hodgkin; LH: linfoma de Hodgkin; MM: mieloma múltiple; LA: leucemia aguda; LMC: leucemia mieloide crónica; CO: cáncer de ovario; TG: tumor de células germinales; CPA: ciclofosfamida; TT: tiotepa; CB: carboplatino; MTZ: mitoxantrone; VP16: etopósido; CP: cisplatino.

En una parte de las pacientes con carcinoma de mama (CM) se utilizó el protocolo STAMP-V, a base de ciclofosfamida (CPA) 1,5 g/m²/día durante 4 días (dosis total: 6 g/m²), carboplatino (CB) 200 mg/m²/día durante 4 días (dosis total: 800 mg/m²) y Thiotepa (TT) 125 mg/m²/día durante 4 días (dosis total: 500 mg/m²)⁵⁶.

Las restantes pacientes con CM fueron incluidas en un protocolo prospectivo de escalada de dosis a partir del régimen STAMP-V¹⁵⁷. Dicho protocolo comprendió la adición de dosis crecientes de mitoxantrone junto con un aumento de la dosis de CB (ver la Tabla 2). Tras cinco pasos de escalada de dosis, se alcanzaron toxicidades limitantes de dosis en forma de mucositis y tubulopatía renal y se aceptó como dosis máxima tolerada la combinación de CPA 6 g/m², CB 1,4 g/m², TT 500 mg/m² y mitoxantrone 40 mg/m², todos ellos repartidos en 5 días. Los niveles mayores de escalada de dosis se administraron junto con terapia "anti-TNF" a base de ciprofloxacino 500 mg/12 h VO, dexametasona 4 mg/12h IV y pentoxifilina 2 g/24 h IV en infusión continua³⁵.

En los pacientes con linfoma no Hodgkin se utilizó el protocolo BEAC, a base de BCNU 300 mg/m² IV el día -6, etopósido 100 mg/m² IV cada 12 horas del día -5 al -2 (dosis total: 800 mg/m²), citarabina 200 mg/m² IV cada 24 horas los días -5 al -2 (dosis total: 800 mg/m²) y CPA 35 mg/kg IV cada 24 horas los días -5 al -2 (dosis total: 140 mg/kg)^{148, 169}.

Los pacientes con linfoma de Hodgkin recibieron el régimen de acondicionamiento CBV, consistente en BCNU 300 mg/m² IV el día -5, etopósido 100 mg/m² IV cada 12 horas del día -5 al -3 (dosis total: 600 mg/m²) y CPA 1,5 g/m² IV cada 24 horas los días -5 al -2 (dosis total: 6 g/m²)^{149, 169}.

Los primeros pacientes con mieloma incluidos en el programa, así como los diagnosticados de leucemia aguda y leucemia mieloide crónica recibieron el régimen Bu-Cy de Santos *et ál.*, a base de busulfan 1 mg/kg VO cada 6 horas del día -7 al -4 (dosis total: 16 mg/kg) y CPA 60 mg/kg IV al día los días -3 y -2 (dosis total: 120 mg/kg)^{147, 169}.

A partir de septiembre de 1994 los pacientes con mieloma múltiple fueron acondicionados con melfalán 100 mg/m² IV al día durante dos días (dosis total: 200 mg/m²)¹⁵⁰.

Las pacientes con carcinoma de ovario fueron incluidas en un programa de doble trasplante con el régimen DICEP de alta dosis (HD-DICEP)¹⁵³. En este protocolo, los pacientes recibieron cisplatino (CP) a dosis de 75 mg/m² al día los días 1 y 5 (dosis total: 150 mg/m²), VP16 a 300 mg/m² al día los días 1 al 3 (dosis total: 900 mg/m²) y CPA a 2,25 g/m² al día los días 4 y 5 (dosis total: 4,5 g/m²). Este mismo régimen fue utilizado en dos enfermos con tumor de células germinales. Entre los dos trasplantes medió un intervalo entre dos y tres meses.

7 – REINFUSIÓN CELULAR

Transcurrido un margen de seguridad de entre 48 y 72 horas tras el final de la quimioterapia de acondicionamiento se procedió a la reinfusión del producto celular.

Se utilizó una premedicación a base de actocortina 100-200 mg IV, metoclopramida 10 mg IV, desclorfeniramina 5 mg IV y furosemida 10-20 mg IV. La infusión se llevó a cabo en la habitación de aislamiento del paciente con control de constantes y presión venosa central.

Las bolsas de producto celular –con un volumen máximo de 200 ml cada una- se descongelaron en un baño térmico a 38° C durante 2 a 3 minutos. Inmediatamente después de su descongelación fueron infundidas en frío sin lavar en un tiempo inferior a 15 minutos. La infusión se llevó a cabo a través de un filtro de 170 micras y por una vía venosa central, con un intervalo entre bolsas de 15 a 20 minutos.

En los pacientes incluidos en el programa de doble trasplante, el producto celular obtenido tras una única movilización fue repartido para el soporte de ambos tratamientos. En el resto de los casos, la totalidad del producto extraído en las leucoaféresis fue infundido, sin almacenar producto de reserva. Tampoco fue preciso reinfundir en ningún caso los PH medulares recogidos como producto de reserva en los primeros pacientes de la serie.

Como se ha mencionado anteriormente, el día de la infusión se consideró como “día cero” para la cuantificación de la cinética del injerto.

8 – MANEJO CLÍNICO DEL PACIENTE Y CRITERIO TRANSFUSIONAL

Los pacientes permanecieron ingresados en habitaciones individuales con medidas de aislamiento invertido simple mientras el recuento de granulocitos permaneció por debajo de $0.5 \times 10^9/l$. Para los pacientes con tumores hematológicos se utilizaron habitaciones con aire filtrado a presión positiva dentro de una unidad de aislamiento específica. El cuidado corrió a cargo de equipos médicos y de enfermería con experiencia en el manejo de pacientes oncohematológicos críticos y presencia física las 24 horas. Se realizaron controles analíticos con periodicidad diaria (hemograma, creatinina, ionograma, urea) o dos veces por semana (bioquímica general, coagulación, etc). Se utilizaron quinolonas de amplio espectro y antifúngicos azólicos por vía oral de forma profiláctica.

En caso de fiebre o focalidad infecciosa durante la neutropenia se instauró inmediatamente tratamiento antibiótico con una cefalosporina de tercera generación con actividad antipseudomona asociada a un aminoglucósido y a un glicopéptido o alternativamente una quinolona de amplio espectro intravenosa asociada a un glicopéptido. En caso de nuevo pico febril o persistencia de fiebre tras 4-7 días del inicio de los antibióticos se añadió anfotericina B.

La mayor parte de los pacientes recibió factores de crecimiento hematopoyéticos tras el trasplante con objeto de acelerar la recuperación granulocítica. Los pacientes con neoplasias hematológicas fueron incluidos en dos protocolos prospectivos randomizados sucesivos que investigaban este aspecto. Los primeros pacientes fueron randomizados entre tres brazos: uno sin factor de crecimiento, otro que recibía $5 \mu\text{g/kg}$ al día de filgrastim por vía subcutánea a partir del día +1 hasta el injerto granulocítico estable y un tercero que recibía la misma dosis de filgrastim pero a partir del día +7 postrasplante. Este estudio demostró la mayor rapidez en el injerto de los brazos con G-CSF respecto del brazo sin factor de crecimiento, pero no hubo diferencias entre el inicio el día +1 o el día +7. Tras cerrarse este estudio, se puso en marcha otro que randomizaba a los pacientes

entre un brazo con filgrastim a la dosis mencionada desde el día +7 y otro con molmograstim (GM-CSF) a la misma dosis y también desde el día +7. Los pacientes con tumores sólidos recibieron en su mayor parte 5 µg/kg de filgrastim subcutáneo desde el día +1.

Se administraron transfusiones profilácticas de plaquetas ante recuentos inferiores a $20 \times 10^9/l$. Las transfusiones fueron en su mayor parte productos de donación dirigida mediante aféresis, en ocasiones dividiendo un producto para 2 transfusiones. En ausencia de plaquetas de aféresis se administraron dosis de 10 unidades por kg de peso de plaquetas *random* procedentes de donaciones de sangre total. Se procuró la transfusión plaquetaria isogrupo siempre que fue posible. Ante la sospecha de refractariedad inmunológica (bajos rendimientos transfusionales en ausencia de otras causas de consumo plaquetar) se administraron ciclos de inmunoglobulina humana poliespecífica IV a altas dosis (0,4 g/kg/día durante 5 días). En casos de retraso prolongado del injerto plaquetar (más allá de seis semanas) en ausencia de causas de consumo plaquetar acelerado, el umbral para la transfusión profiláctica se bajó hasta $10 \times 10^9/l$.

Se indicaron transfusiones de hematíes ante recuentos inferiores a 9 g/dl de hemoglobina. Salvo circunstancias excepcionales, el número mínimo de unidades de hematíes concentrados (UHC) transfundidos cada vez fue de dos.

9 – EVALUACIÓN ANALÍTICA

El seguimiento analítico de los pacientes incluyó –entre otras determinaciones- un hemograma previo a la movilización (en situación basal), y un hemograma diario durante los días de extracción celular y desde el tratamiento de acondicionamiento hasta la recuperación hematopoyética. Los hemogramas se realizaron mediante contadores celulares Coulter STKR o Technicon H1 y recuentos diferenciales manuales en los pacientes en recuperación. A partir de abril de 1994 se comenzaron a realizar recuentos de células CD34+/CD33- en sangre periférica los días de las leucoaféresis según la técnica especificada más adelante. A partir de octubre de este mismo año, se comenzó a realizar asimismo un recuento basal (antes de comenzar la movilización). Como se especifica en la descripción de las variables, los datos aportados por estas analíticas han sido utilizados en el análisis estadístico de la serie.

Para el análisis de los productos celulares utilizados en el trasplante se tomaron muestras de la bolsa de recolección tras deshacer los agregados y agitar prolongadamente el producto. Las muestras fueron introducidas en tubos con EDTA y se comenzaron a procesar antes de una hora. En cada una de ellas se realizaron recuentos celulares automáticos, recuento diferencial manual, cuantificación de unidades formadoras de colonias granulocito-monocíticas (CFU-GM) y -a partir de febrero de 1993- cuantificación de células CD34+/CD33- por citometría de flujo, además de los controles microbiológicos, de viabilidad y de presencia de enfermedad residual. Nuevas muestras para controles de calidad del producto fueron extraídas tras el procesamiento y al adición de DMSO pero antes de la criopreservación y tras la descongelación y filtrado del producto para su infusión. Los resultados de los recuentos de estas muestras fueron contrastados con los de la muestra inicial para investigar cualquier discrepancia. Para el presente estudio se han utilizado los resultados obtenidos en el producto en fresco, antes de su procesamiento.

9.1 – Recuentos celulares

La cuantificación de células nucleadas totales (CT) se llevó a cabo mediante contadores celulares automáticos. De cada muestra se realizaron dos recuentos con dos contadores diferentes: un Technicon H1 y un Coulter STKS. Un tercer recuento realizado en una nueva muestra (la extraída tras el procesamiento pero antes de la criopreservación) sirvió como control adicional. Cualquier discrepancia mayor del 10% entre ambos recuentos fue investigada. Las muestras se diluyeron hasta una proporción de 1:10 con suero salino antes de los contajes automáticos. Para el análisis estadístico se han tenido en cuenta los recuentos de la muestra pre-procesamiento proporcionados por el contador Coulter. La variable estudiada, como se indica más adelante, es el número de CT por kg de peso. La fórmula utilizada para hallar este dato es la siguiente:

$CT \times 10^8 / Kg$	=	$\frac{\text{Leucocitos } \times 10^9 / l \text{ en muestra diluida al 1:10}}{\text{Peso en Kg}} \times 10$	$\times \frac{\text{Volumen de la bolsa en ml}}{10}$
-----------------------	---	---	--

Como se ha mencionado en el fundamento científico del trabajo, la estimación de células mononucleares (CMN) puede realizarse mediante los recuentos automáticos o de forma manual, sin que hoy en día esté aclarado cual de los dos procedimientos resulta más apropiado en el TPH. En este trabajo se han estudiado ambos tipos de recuentos. Para la estimación automática se utilizó el recuento diferencial del contador Technicon H1. Se sumaron los porcentajes atribuidos a los canales de linfocitos, monocitos y LUC (*large unstained cells*). En este último canal el contador H1 incluye células de tamaño grande negativas tras la tinción de peroxidasas. En un producto de leucoaféresis para trasplante generalmente hay un porcentaje no despreciable de LUC, entre las cuales pueden incluirse elementos linfoides y monocíticos inmaduros, células blásticas y otros

progenitores hematopoyéticos. Por este procedimiento, las células inmaduras pero con diferenciación granulocítica (promielocitos, mielocitos, etc) quedan excluidas del recuento de CMN.

El recuento manual de CMN se llevó a cabo en un frotis del producto de aféresis teñido con colorante de Wright y examinado por un hematólogo. Se incluyeron en el recuento todas las células de núcleo único aunque presentaran diferenciación granulocítica (promielocitos y mielocitos), y se excluyeron todas aquellas con núcleo indentado o múltiple (a partir de metamielocito).

En uno y otro caso, el porcentaje de CMN hallado en el recuento diferencial se aplicó al número de CT por kg de peso hallado según la fórmula señalada más arriba.

9.2 – Cultivos de CFU-GM

Para el cultivo de CFU-GM se preparó en primer lugar una capa alimenticia o *feeder layer* en medio semisólido. Brevemente, se preparó una solución de agar al 0,5% en medio de cultivo McCoy's 5A con penicilina, estreptomina y glutamina y plasma rico en leucocitos obtenido por sedimentación simple de muestras frescas de sangre periférica de donantes sanos. Esta capa se dejó solidificar en placas de Petri. En estas capa se sembraron las muestras celulares previamente resuspendidas en medio McCoy's 5A con antibióticos y glutamina y un 20% de suero de ternera fetal descomplementado. No se añadieron más factores de crecimiento exógenos. Se sembraron 3 placas por muestra. Las placas así sembradas se cultivaron durante 14 días en una estufa a 37° C con 5% de CO₂ y en ambiente saturado de humedad. Al cabo de este tiempo, las placas fueron examinadas en fresco mediante un invertoscopio. Los resultados se expresaron como número de unidades formadoras de colonias x 10⁴ por kg de peso del paciente.

9.3 – Citometría de flujo

La estimación de PH mediante citometría de flujo se basó en la cuantificación de la subpoblación de células CD34+/CD33-. En un principio se escogió esta subpoblación celular con base en consideraciones teóricas. Al tratarse de un fenotipo celular correspondiente a progenitores hematopoyéticos no comprometidos hacia la línea mieloide podría constituir un buen estimador de la calidad de un producto celular cuyo fin era generar un injerto estable multilineal. Esta hipótesis se investigó en varios análisis preliminares sucesivos a medida que la serie de trasplantes iba creciendo. Al comprobarse la idoneidad de este marcador para predecir un injerto multilineal se adoptó como estándar en el programa de trasplante. En ningún momento se llegó a utilizar la determinación de células CD34+ totales ni se comparó este marcador con la subpoblación CD34+/33-.

Para el estudio citométrico se utilizaron muestras del producto de aféresis o de sangre periférica conteniendo $2,5 \times 10^6$ células totales. Los hematíes fueron lisados mediante el sistema Coulter Immunoprep Epics Leukocyte Preparation System. Tras dos lavados con solución tampón PBS con 0,3% de albúmina sérica bobina se incubaron durante 30 minutos en la oscuridad con una mezcla de anticuerpos. Esta comprendía 10 μ l de anti CD34 Q-BEND 10 conjugado con ficoeritrina (Immunotech) y 1,5 μ l de anti CD33 conjugado con FITC (Clon 251 de Caltag). El análisis citométrico de dos colores se llevó a cabo con un equipo Coulter Epics Profile II. El estudio se llevó a cabo en una población seleccionada previamente por su baja complejidad citoplásmica (*side scatter*). Los porcentajes obtenidos (con respecto al número total de células de la muestra) fueron aplicados al recuento de CT obtenido con anterioridad en el caso del producto de aféresis o al recuento leucocitario de sangre periférica en su caso.

10 – ANÁLISIS ESTADÍSTICO

10.1 – Variables

Los datos clínicos del paciente previos al autotrasplante fueron recogidos de la historia clínica durante la serie de leucoaféresis o el día de la reinfusión celular. Las variables analíticas y técnicas relacionadas con los procesos de aféresis y los estimadores de calidad del injerto (recuentos celulares, de colonias y citometría de flujo) se obtuvieron directamente de los registros de la Unidad de Aféresis. Los datos clínicos referentes al injerto y a la evolución postinfusión fueron recabados de la historia clínica del paciente y de los hematólogos y oncólogos clínicos responsables de su asistencia. Los datos sobre consumo de hemoderivados se obtuvieron directamente de los registros del Banco de Sangre.

Con objeto de preservar toda la información estadística aportada por las variables continuas se han mantenido como tales, evitando su transformación en variables categóricas.

A continuación se detalla cada una de las variables empleadas como independientes o dependientes a lo largo de las distintas partes del estudio.

- *Edad.* Expresada en años
- *Volemia.* En litros, calculada mediante tablas en función del peso y la talla.
- *Grupo sanguíneo ABO.*
- *Diagnóstico.* Para su análisis se transformó en múltiples variables dicotómicas (*variables dummy*). Con objeto de mantener un tamaño muestral suficiente, para el análisis estratificado se consideraron cuatro grupos: cáncer de mama,

linfoma, mieloma y otros. Dentro del grupo "linfoma" se incluyeron la Enfermedad de Hodgkin y el linfoma no Hodgkin, una vez comprobada la falta de diferencias relevantes entre estos dos grupos en las variables de análisis.

- *Estadio*. Variable estudiada exclusivamente en el subgrupo de cáncer de mama y como variable dicotómica: metastático vs. no metastático.
- *Medula ósea previa*. Infiltración medular por el tumor en algún momento de la evolución de la enfermedad. Variable dicotómica
- *Medula ósea en el momento del trasplante*. Infiltración medular en la evaluación pretrasplante. Variable dicotómica
- *Enfermedad extramedular*. Presencia de enfermedad en cualquier localización no medular en la evaluación pretrasplante. Variable dicotómica.
- *Remisión completa*. Presencia de remisión completa o estatus de "no evidencia de enfermedad" (en el caso de tumores sólidos) en la evaluación pretrasplante. Variable dicotómica.
- *Radioterapia previa*. Tratamiento previo con radioterapia en algún momento de la enfermedad. Variable dicotómica.
- *Número de líneas de tratamiento previas*. Número de líneas recibidas desde el diagnóstico de la enfermedad. La radioterapia se consideró una línea de tratamiento.
- *Número de ciclos de quimioterapia recibidos*. Ciclos recibidos desde el diagnóstico de la enfermedad.
- *Leucocitos basales*. Cifra absoluta de leucocitos ($\times 10^9/l$) en SP antes de la movilización

- *Plaquetas basales.* Cifra absoluta de plaquetas ($\times 10^9/l$) en SP antes de la movilización.
- *CD34+/33- basal.* Cifra absoluta de células CD34 ($\times 10^6/l$) en SP antes de la movilización.
- *Porcentaje de CD34+/33- basal.* Porcentaje respecto del total de leucocitos en SP antes de la movilización.
- *Incremento de leucocitos.* Cociente entre la cifra de leucocitos en SP el 5ª día de movilización y la cifra basal.
- *Incremento de plaquetas.* Cociente entre la cifra de plaquetas en SP el 5ª día de movilización y la cifra basal.
- *Incremento de CD34+/33-.* Cociente entre la cifra absoluta de CD34+/33- en SP el 5ª día de movilización y la cifra basal.
- *Incremento del porcentaje de CD34+/33-.* Cociente entre el porcentaje de CD34+/33- respecto del total de leucocitos en SP el 5º día de movilización y el porcentaje basal.
- *Leucocitos el 5º día de movilización.*
- *Plaquetas el 5º día de movilización.*
- *Porcentaje de CD34+/33- el 5º día de movilización.* Respecto del total de leucocitos en SP.
- *CD34+/33- en SP el 5º día de movilización.* Cifra absoluta $\times 10^6/l$.
- *Pico de CD34+/33- en SP.* Cifra máxima de CD34+/33- en SP alcanzada durante la movilización ($\times 10^6/l$).

- *Día de máxima movilización.* Día en que se alcanza el pico de CD34+/33-, contado desde el primer día de administración de G-CSF. Codificado como variable categórica con tres valores: 4º, 5º y 6º día y transformado en variables dicotómicas múltiples (*dummy*) para el análisis.
- *Número de leucoaféresis.*
- *Leucoaféresis problemática.* Se consideró como tal aquella en la que por cualquier causa, generalmente por problemas relacionados con la continuidad del flujo a través del catéter central, en alguno de los procedimientos de aféresis hubo interrupciones frecuentes, múltiples alarmas, duración excesiva del proceso, etc. Variable dicotómica.
- *Células totales (CT).* Número total de células recolectadas entre todas las aféresis. Expresado x 10⁸ por kg de peso.
- *Porcentaje de células mononucleares (micro).* Porcentaje de CMN obtenido tras el examen microscópico con tinción de Wright del frotis del producto de aféresis.
- *Células mononucleares (micro).* Número total de CMN obtenidas x 10⁸/kg (según el examen microscópico).
- *Porcentaje automático de células mononucleares.* Porcentaje de CMN en el producto de aféresis según el hemograma del contador Technicon H1, que incluye tinción de peroxidasa. Se sumaron para obtener el porcentaje de CMN los de los canales de linfocitos, monocitos y LUC (*large unstained cells* o células grandes peroxidasa negativas).
- *Células mononucleares (recuento automático).* Número total de CMN x 10⁸/kg según el porcentaje automático.
- *Porcentaje de CD34+/33-.* Porcentaje respecto del número de CT en los productos obtenidos.

- *CD34+/33-*. Número total de células CD34+/33- x 10^6 /kg en el producto de aféresis.
- *CD34+/33- por día de aféresis*. Número de células CD34+/33- x 10^6 /kg dividido entre el número de aféresis realizadas.
- *CD34+/33- por volemia procesada*. Número de células CD34+/33- x 10^6 /kg dividido entre el número total de volemias procesadas en las distintas aféresis.
- *CFU-GM*. Número de unidades formadoras de colonias granulocito-monocíticas x 10^4 /kg en el producto de aféresis.
- *Acondicionamiento*. Esquema de quimioterapia de acondicionamiento empleado. Variable categórica que para el análisis se transformó en múltiples variables dicotómicas (*dummy*).
- *CSF postrasplante*. Administración de factor de crecimiento postrasplante. Variable con cuatro categorías: ningún CSF, G-CSF desde el día +1, G-CSF desde el día +7 y GM-CSF desde el día +7. Para otros análisis se transformó en variable dicotómica: sin factor de crecimiento *versus* con factor de crecimiento.
- *Tiempo de injerto granulocítico*. Días desde la infusión celular ("día 0") hasta que el paciente después del periodo de aplasia vuelve a alcanzar $0,5 \times 10^9$ /l granulocitos en SP.
- *Tiempo de injerto plaquetar*. Días desde la infusión celular ("día 0") hasta que el paciente después del periodo de aplasia vuelve a alcanzar 20×10^9 /l plaquetas durante dos días consecutivos no debidas a transfusión.
- *Transfusiones de plaquetas*. Número de transfusiones de plaquetas, ya sea una bolsa de plaquetas de aféresis o una unidad por cada 10 kg de peso de plaquetas *random*, administradas en el postrasplante.

- *Concentrados de hematíes (CH)*. Número de bolsas de CH transfundidas en el postrasplante.

10.2 – Estadística descriptiva y estudio de normalidad

Para comprobar la hipótesis de la distribución normal de las variables continuas se utilizó el Test de Kolmogorov-Smirnov con la Corrección de Lilliefors.

Las medidas de centralización y dispersión utilizadas para las variables no normales fueron la mediana y los valores extremos. En algunas ocasiones se ha incluido también el rango intercuartílico (RIC). En el caso de las variables de distribución normal se han empleado la media con intervalo de confianza del 95% y la desviación típica (DT).

En algunas ocasiones se utilizan *gráficos de caja y bigotes* para la presentación de resultados. Este tipo de gráficos muestra una caja cuyos extremos inferior y superior corresponden respectivamente con los cuartiles primero y tercero. En el interior de la caja una línea muestra la mediana muestral. De la parte inferior y superior de la caja surgen unas líneas –los *bigotes*– que alcanzan los valores extremos de dicha variable, excluyendo los *outliers*.

Los tiempos de injerto, por tratarse de variables temporales e incluir observaciones incompletas (*censored values*) –que serían los pacientes que fallecen antes de conseguir la recuperación hematopoyética completa– se estudian con técnicas de análisis de supervivencia. Se han utilizado curvas de Kaplan-Meier y los tiempos de injerto granulocítico y plaquetar se expresan en forma de mediana actuarial con intervalo de confianza del 95%.

Junto con la presentación descriptiva de los resultados de movilización se analiza la significación estadística del descenso en la cifra de plaquetas tras la administración de G-CSF. Para ello se utilizó el Test de los Rangos con Signo de Wilcoxon para muestras pareadas.

10.3 – Análisis de los factores que influyen sobre el injerto

Como variables dependientes para esta parte del estudio se escogieron cuatro parámetros. Dos de ellos son estimadores directos del tiempo de recuperación hematopoyética: el tiempo de injerto granulocítico y el tiempo de injerto plaquetar, tal y como están definidos más arriba. Los otros dos cuantifican el consumo transfusional: el número de transfusiones de plaquetas y el de unidades de CH transfundidas. Puesto que el manejo clínico de los pacientes incluyó transfusiones profilácticas en presencia de anemia o trombopenia, son estimadores indirectos de la velocidad de injerto, y además el número de CH aporta información sobre la precocidad y estabilidad del injerto en la serie eritroide.

En primer lugar se estudió con técnicas univariantes la relación entre cada una de las variables independientes y cada una de las cuatro variables dependientes mencionadas. Para estudiar la influencia de las variables dicotómicas sobre los tiempos de injerto se utilizó el Test de Log-Rank (como hemos mencionado antes, son variables temporales con observaciones incompletas). Para estudiar su influencia sobre el consumo transfusional se utilizó el test de Mann-Whithney en el supuesto de que alguno de los grupos definidos en la variable dependiente por la variable dicotómica siguiera una distribución distinta de la normal (lo más frecuente en la práctica). En los casos en que ambos grupos seguían la distribución normal se utilizó la prueba de T para dos muestras, una vez comprobada la igualdad de varianzas. Las variables categóricas con más de dos categorías se transformaron en variables dicotómicas múltiples (*variables dummy*) según los criterios especificados

más arriba, y el análisis se realizó con cada una de estas variables dicotómicas. Para el estudio univariante de la relación entre una variable independiente continua y cualquiera de las variables dependientes -igualmente continuas- se utilizó el Test de Correlación por Rangos de Spearman.

Para el estudio multivariante de las variables temporales (tiempos de injerto granulocítico y plaquetar) se utilizó el Test de los Riesgos Proporcionales o Test de Cox. Se tuvieron en cuenta para el modelo todas aquellas variables con una influencia significativa o cercana a la significación ($P \geq 0,1$) sobre la variable dependiente en el análisis univariante previo. Las variables fueron introducidas hacia delante según el aumento de la razón de verosimilitud. El supuesto de proporcionalidad de los riesgos fue analizado mediante el análisis de curvas *log menos log* y la introducción de covariables dependientes del tiempo como términos de interacción. Asimismo se evitó la presencia simultánea en el modelo de variables con alta colinealidad (correlación entre ellas $\geq 0,8$). Se requirió la presencia de al menos ocho casos por cada variable independiente introducida en el análisis del grupo global y de al menos seis para el análisis estratificado. Para las variables significativas se presenta el valor de P y el riesgo relativo (*relative hazard*) con su intervalo de confianza del 95%.

El estudio multivariante de los factores que influyen sobre el consumo transfusional se realizó mediante regresión lineal múltiple. Se tuvieron en cuenta todas aquellas variables con una influencia significativa o cercana a la significación sobre la variable dependiente en el análisis univariante previo. Se utilizó el método de entrada de variables hacia delante con un límite de probabilidad de F para la entrada de 0,05 y para la salida del modelo de 0,1. Se evitó la presencia simultánea en el modelo de variables con alta colinealidad (correlación entre ellas $\geq 0,8$ ó tolerancia $\leq 0,05$). Se presenta la P para cada variable y el coeficiente de correlación no estandarizado (B) para cada variable con su intervalo de confianza del 95%.

Debido a la relevancia clínica de la diferencia entre las distintas neoplasias en las que se utiliza el trasplante hematopoyético (frecuencia de infiltración medular o de sangre periférica, comportamiento clínico y biológico, modalidades de

tratamiento, etc), reflejada asimismo en la significación estadística de la variable *diagnóstico*, se decidió realizar un análisis estratificado. Todo el estudio uni y multivariante de factores sobre el injerto hematopoyético fue repetido en tres subgrupos diagnósticos: cáncer de mama, linfoma (Hodgkin y no Hodgkin) y mieloma múltiple.

10.4 – Análisis comparativo de los estimadores de calidad del producto

Se ha considerado como criterio de calidad primordial la consecución de un injerto hematopoyético precoz. En consecuencia, la calidad del producto celular utilizado en el trasplante se ha valorado en la medida en la que es capaz de garantizar este injerto. Se han considerado estimadores de calidad del injerto aquellas variables que intentan cuantificar directa o indirectamente el número de PH. En este apartado se presenta el estudio univariante de la relación de cada uno de estos parámetros con los tiempos de injerto mediante diagramas de dispersión. Esta relación, así como la de los distintos estimadores entre sí, se han analizado mediante el Coeficiente de Correlación por Rangos de Spearman, dado que la mayor parte de las variables no seguían la distribución normal. Posteriormente, la variable CD34+/33- se ha transformado en intervalos para facilitar la extrapolación y la aplicación práctica de los resultados. La comparación entre los intervalos se ha estudiado con el test de Log Rank.

10.5 – Análisis del injerto en trasplantes con bajas cifras de PH

Para estudiar taxativamente la precocidad del injerto en los enfermos que recibían un número escaso de progenitores se analizó el grupo de pacientes que

fueron transplantados con una cifra por debajo del percentil 10 de células CD34+/33- o de CFU-GM. Se escogieron estos dos parámetros por ser los que habían mostrado mayor consistencia para estimar la calidad del producto celular en el análisis anterior.

10.6 – Análisis predictivo de la recolección de PH

En este caso, el objetivo del análisis no era simplemente estudiar si una serie de factores influyen significativamente sobre una determinada variable dependiente, sino intentar predecir el resultado de esta variable con la mayor precisión posible. La variable que se escogió como punto final fue la cifra total de células CD34+/33- recolectadas. Se escogió este parámetro como objeto de la estimación por haber resultado en los análisis anteriores el más adecuado de los estudiados para estimar el número de PH en la clínica.

Al tratarse de un modelo predictivo, se buscó su validación en una muestra distinta a la utilizada para su cálculo. Para ello, se dividió asimétricamente la serie de trasplantes descrita en dos grupos: un *grupo de cálculo* y un *grupo de validación*. El criterio fue cronológico; se incluyeron en el grupo de validación los últimos 32 trasplantes realizados. Todos los anteriores fueron incluidos en el grupo de cálculo y utilizados para derivar el modelo.

En el grupo de cálculo se llevó a cabo en primer lugar un estudio univariante utilizando el Test de Mann-Withney o el Coeficiente de Correlación de Spearman en variables dicotómicas y continuas respectivamente. Las variables con varias categorías fueron transformadas para el análisis en variables dicotómicas múltiples (*variables dummy*) como se comentó anteriormente.

Las variables significativas o cercanas a la significación fueron probadas en la construcción de un modelo de regresión lineal simple, siempre dentro del grupo de

cálculo. Se consideró adecuado este procedimiento a pesar de la desviación de las variables continuas respecto de la distribución muestral por el elevado tamaño muestral. Como se mencionó en el punto 10.3, se utilizó la introducción hacia delante paso a paso y se evitó la coexistencia de variables con alta colinealidad. Se buscó la definición de un modelo con el mayor coeficiente de determinación corregido (R^2c) y un número reducido de variables para facilitar su uso.

El modelo de regresión definido en el grupo de cálculo fue utilizado para predecir la cifra de células CD34+/33- en el grupo de validación. El valor calculado con esa fórmula fue comparado con el valor real.

10.7 – Análisis de los factores que influyen sobre la movilización

En este apartado el objetivo era estudiar qué factores influían de forma independiente sobre el resultado de la movilización de PH. Se escogió como punto final la cifra de células CD34+/33- en SP el quinto día de movilización. Naturalmente, no se pretendió predecir con precisión esta cifra en función de variables previas del paciente como el diagnóstico, el estatus de la enfermedad, etc, y por ello no se planteó la validación de este modelo.

Los métodos de análisis fueron los mismos que para el consumo de hemoderivados y la recolección de PH: los Tests de Spearman y Mann-Whitney en el estudio univariante y la regresión lineal múltiple en el multivariante.

10.8 – Programa informático

Para el manejo y análisis de los datos y la elaboración de algunos gráficos se ha utilizado el paquete estadístico SPSS versión 9.0.1.

Para la elaboración de los restantes gráficos y la edición del trabajo se ha utilizado el procesador de textos Microsoft Word 2000.

RESULTADOS

1- CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES Y LOS TRASPLANTES

Se han incluido en el análisis un total de 211 trasplantes de PH consecutivos realizados a 203 pacientes durante el periodo de estudio. No ha sido excluido ningún trasplante llevado a cabo en nuestro hospital durante este intervalo de tiempo (febrero de 1992 a marzo de 1996). Ocho de los pacientes (5 con cáncer de ovario, dos con sarcoma de Ewing y una con mieloma múltiple) fueron sometidos a dos

trasplantes sucesivos, con un intervalo de uno a tres meses entre ellos.

	PACIENTES	TRASPLANTES
Carcinoma de mama	111	111
Estadios II y III	40	40
Estadio IV	71	71
Linfoma no Hodgkin	33	33
Mieloma múltiple	25	26
Linfoma de Hodgkin	14	14
Carcinoma de ovario	6	11
Leucemia mieloide crónica	3	3
Leucemia aguda mieloblástica	3	3
Leucemia aguda linfoblástica	2	2
Sarcoma de Ewing	2	4
Tumor germinal	2	2
Carcinoma micr.de pulmón	1	1
Sarcoma uterino	1	1
TOTAL	203	211

Tabla 3 – Diagnósticos

La distribución por diagnósticos de los pacientes es la siguiente: 111 con carcinoma de mama –40 loco-regionalmente avanzado y 71 metastático-, 33 con linfoma no Hodgkin, 25 con gammapatía monoclonal (24 mielomas múltiples y un plasmocitoma óseo solitario), 14 con linfoma de Hodgkin, 6 con carcinoma de ovario, 3 con leucemia mieloide crónica, 3 con leucemia aguda mieloblástica, 2 con leucemia aguda linfoblástica, 2 con sarcoma de Ewing, 2 con tumores germinales, 1 con carcinoma

microcítico de pulmón y 1 con sarcoma uterino (Tabla 3).

En la tabla 4 se recogen los trasplantes realizados con cada uno de los regímenes de acondicionamiento utilizados en la serie.

Un total de 146 pacientes –incluyendo casi todos los enfermos con tumores no hematológicos– recibieron G-CSF subcutáneo a partir del día +1 postinfusión. De los restantes pacientes, 34 recibieron G-CSF desde el día +7 postinfusión, 18 no recibieron ningún factor de crecimiento y 13 recibieron GM-CSF desde el día +7. En la tabla 5 se detalla la pauta de administración de factores de crecimiento postrasplante según los grupos diagnósticos de estratificación. En los pacientes con carcinoma de mama esta variable ha sido excluida del análisis.

STAMP-V	39
Escalada de dosis desde STAMP-V	72
Nivel 1	12
Nivel 2	20
Nivel 3	14
Nivel 4	4
Nivel 5	3
Nivel 6	19
BEAC	34
BuCy	24
HD-DICEP	14
CBV	13
Melfalán	10
Otros	5

Tabla 4 – Regímenes de acondicionamiento

La edad de los pacientes en el momento del trasplante estuvo comprendida entre 17 y 67 años, con una media de 45,4 y desviación típica de 11,7. Las medias de edad en los distintos grupos diagnósticos fueron de 45 años (IC 95%: 44-47; DT: 8,8) en el de cáncer de mama, 40 años (IC 95%: 36-44; DT: 13,1) en el de linfoma y 56 años (IC 95%: 53-58; DT:6,6) en el de mieloma.

	GLOBAL		MAMA		LINFOMA		MIELOMA	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
G-CSF día +1	146	69	109	98	9	19	8	31
G-CSF día +7	34	16	2	2	19	40	10	39
Ningún CSF	18	9	0	0	11	23	4	15
GM-CSF día +7	13	6	0	0	8	17	4	15
TOTAL	211		111		47		26	

Tabla 5 – Factores de crecimiento administrados postinfusión.

La Tabla 6 recoge los estimadores del volumen de tratamiento quimioterápico recibido y las características relativas a la extensión de la enfermedad antes de la movilización y el trasplante.

	<u>GLOBAL</u>		<u>MAMA</u>		<u>LINFOMA</u>		<u>MIELOMA</u>	
	Med	<i>min-max</i>	Med	<i>min-max</i>	Med	<i>min-max</i>	Med	<i>min-max</i>
Líneas de tratamiento previas	2	1-6	1	1-3	2	1-6	1	1-5
Ciclos de quimioterapia recibidos	8	2-31	6	2-15	11	6-26	8	4-31
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Trasplante hematopoyético previo	14	7	0	0	5	11	1	4
Tratamiento previo con radioterapia	44	21	22	20	15	32	4	15
Infiltración de medula ósea en cualquier momento	56	27	2	2	21	45	25	96
Infiltración medular en el momento del trasplante	23	11	1	1	7	15	13	50
Enfermedad extramedular en el momento del trasplante	55	26	32	29	13	28	8	31
Remisión completa en el momento del trasplante	139	66	77	69	31	66	10	38

Tabla 6 – Volumen de tratamiento recibido y extensión de la enfermedad

2 – ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LOS RESULTADOS

2.1 – Movilización

El tratamiento con G-CSF no produjo toxicidad grado III ó IV de la OMS en ningún caso. La mayor parte de los pacientes refirieron dolor óseo leve o moderado, sensible al tratamiento con analgésicos menores.

Antes de la movilización los pacientes presentaban una mediana de $5,2 \times 10^9/l$ leucocitos y $255 \times 10^9/l$ plaquetas. El tratamiento con G-CSF durante cinco días multiplicó la cifra de leucocitos por un factor de entre 2,6 y 72,3 con una mediana de 7,2. El quinto día de movilización los pacientes presentaban una mediana de $37,7 \times 10^9/l$ leucocitos, con un mínimo de 14,8 y un máximo de $107 \times 10^9/l$.

En contraste, tras cinco días de tratamiento con G-CSF la cifra de plaquetas disminuyó en el 83% de los pacientes. Antes de la movilización los pacientes presentaban una mediana de $255 \times 10^9/l$ plaquetas, con valores extremos de 99 y $602 \times 10^9/l$. El quinto día de movilización la mediana de plaquetas fue de $213 \times 10^9/l$, con un mínimo de 77 y un máximo de 343. La diferencia entre las plaquetas basales y las medidas el quinto día de movilización osciló entre $+96 \times 10^9/l$ y $-278 \times 10^9/l$, con una mediana de $-41 \times 10^9/l$. El factor medio de multiplicación de las plaquetas con la movilización fue de 0,83 (DT: 0,19; IC 95%: 0,79-0,87), lo que supone un descenso del 17% en el recuento. La diferencia entre los recuentos de plaquetas pre y postmovilización alcanzó significación estadística ($p < 0,0005$ en el Test de los Rangos con Signo de Wilcoxon).

La disminución en el recuento plaquetario se hace también evidente al analizar por separado los distintos grupos diagnósticos: cáncer de mama (0,83; IC 95%: 0,78-0,88; DT: 0,18), linfoma (0,8; IC 95%: 0,67-0,93; DT: 0,25) y mieloma

(0,83; IC 95%: 0,74-0,92; DT: 0,15). En la Figura 5 se puede apreciar como en los tres subgrupos el tercer cuartil se encuentra por debajo de 1, indicando la disminución de la cifra de plaquetas. En el grupo de pacientes con mieloma, el factor de incremento fue inferior a uno en todos los casos. En ningún caso este descenso de la cifra de plaquetas condujo a una trombopenia clínicamente relevante ni se produjo ningún episodio hemorrágico atribuible. Tan solo 4 de los 96 pacientes en los que se estudió este parámetro presentaron un recuento inferior a $100 \times 10^9/l$ el quinto día, y ninguno llegó a bajar de $75 \times 10^9/l$ (77, 81, 93 y 95).

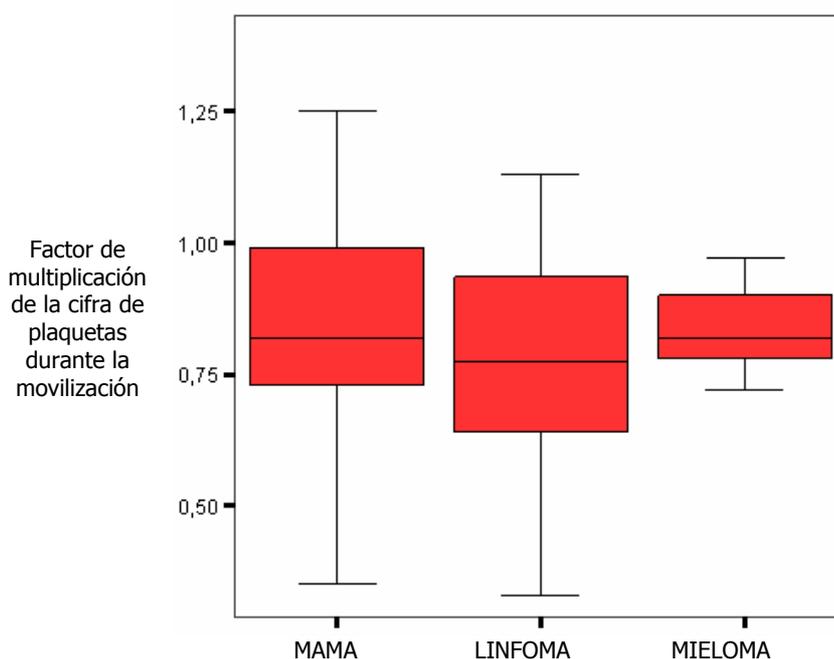


Figura 5 - Factor de multiplicación de la cifra de plaquetas durante la movilización en los distintos grupos diagnósticos. Refleja el cociente de la cifra de plaquetas el quinto día de movilización dividida entre la basal. La altura de la caja representa el rango intercuartílico, la línea que la cruza, la mediana y los "bigotes", los valores extremos excluyendo los *outliers*.

Antes de la movilización los pacientes presentaban una mediana de CD34+/33- en SP de $0,94 \times 10^6/l$ células (0,12-5,3; RIC: 1), que suponían el 0,018% de los leucocitos (0,003-0,15; RIC: 0,018). Con la movilización, el número absoluto de CD34+/33- en SP aumentó en todos los pacientes, multiplicándose por

un factor de 25,5 (1,6-125,5; RIC: 23). El porcentaje de células CD34+/33- se multiplicó por un factor de 3,4 (0,4-16,2).

En el 79% de los pacientes el día de máxima movilización coincidió con el quinto día de administración de G-CSF, en el 19% fue el sexto y el 2% restante lo alcanzó el séptimo día. En la Figura 6 se muestran las cifras medianas de CD34+/33- en SP a lo largo de la movilización.

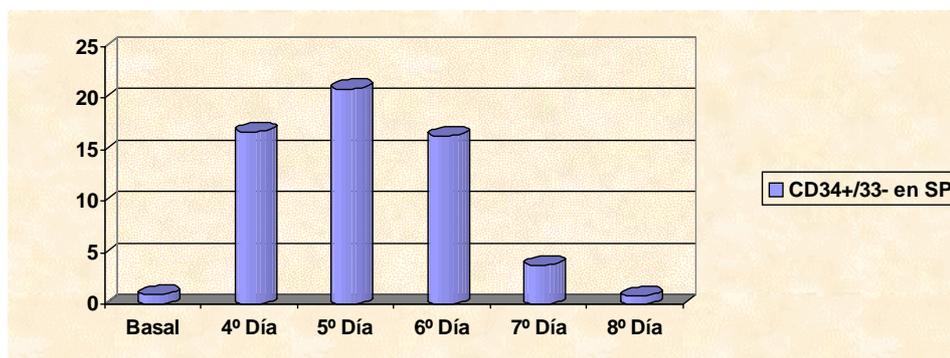


Figura 6 – Mediana de células CD34+/33- x 10⁶/l en sangre periférica a lo largo de la movilización.

La mediana de CD34+/33- en SP el día de máxima movilización fue de 21,4 x 10⁶/l células (1-171; RIC: 30,4), correspondiendo a un 0,054 % de los leucocitos (0,001-0,44; RIC: 0,07). La Figura 7 refleja los resultados de la movilización en los distintos grupos diagnósticos.

Un total de seis pacientes requirieron una segunda movilización por estimarse insuficiente el número de células recogidas con la primera. Como se mencionó anteriormente, los datos analizados de movilización corresponden en todos los casos a la primera.

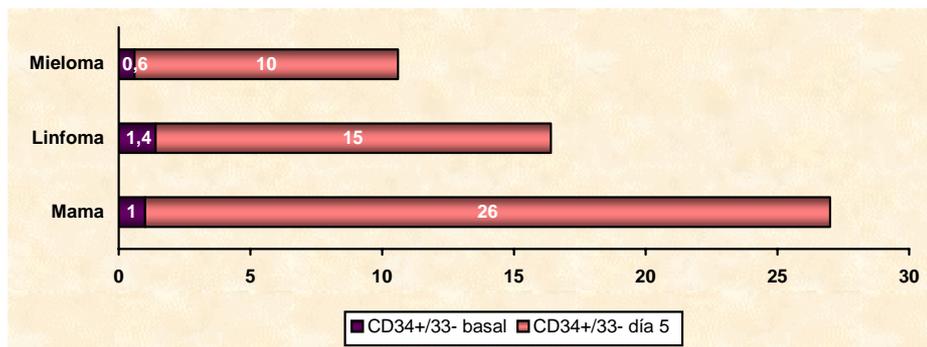


Figura 7 – Efecto de la movilización: comparación de las cifras de CD34+/33- en SP basal y en el quinto día de movilización.

2.2 – Recolección celular

La mayor parte de los pacientes requirieron entre dos y tres aféresis para obtener una recolección suficiente para el trasplante (Fig. 8). La mediana fue de 3, con unos extremos de 1 y 7 (contando las dos movilizaciones cuando fueron necesarias). La mediana de litros de sangre procesados por aféresis (excluyendo el anticoagulante) fue de 9,1 (3,4-14,7; RIC: 2,1), lo que corresponde a 2,35 volemias (1-4,6; RIC: 0,8). En total, se procesó una mediana de 5,6 volemias por movilización (2-11; RIC: 2,1).

La mediana de células totales recolectadas fue $8,5 \times 10^8/\text{Kg}$ (2,1-19,6; RIC: 4), lo que supuso $7,8 \times 10^8/\text{Kg}$ CMN medidas al microscopio (2-17,4; RIC: 3,6) ó $6 \times 10^8/\text{Kg}$ CMN medidas con el contador H1 (1,9-12,4; RIC: 2,8). En el apartado 4 de los resultados se profundiza en la relación entre estas variables.

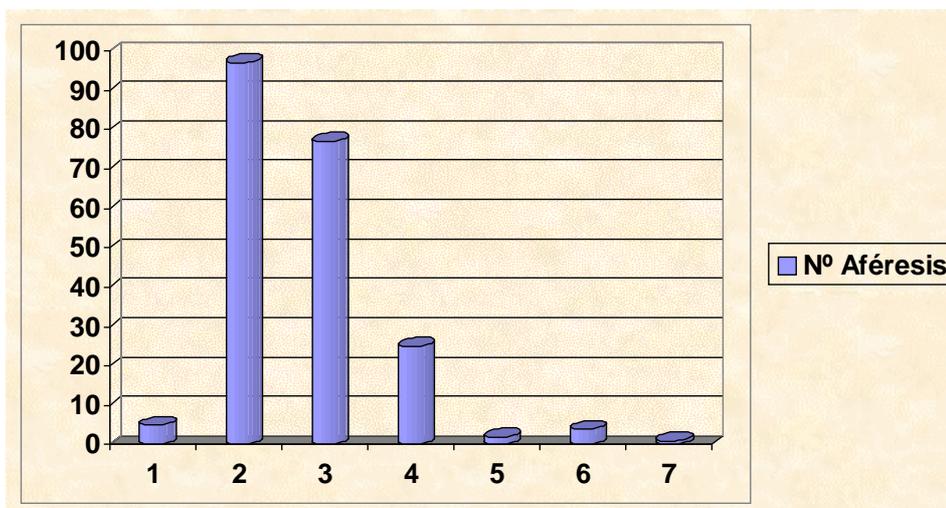


Figura 8 – Número total de aféresis requeridas. En ordenadas se expresa el nº de pacientes.

En el producto recolectado había una mediana de $4,7 \times 10^4/\text{kg}$ CFU-GM (0,17-41,5; RIC: 6,9). El porcentaje de células CD34+/33- respecto de las CT fue del 0,18% (0,012-1,17; RIC: 0,27). En términos absolutos la mediana de células CD34+/33- recolectadas fue de $1,7 \times 10^6/\text{Kg}$ (0,07-11,28; RIC: 1,7). La Tabla 7 muestra las cifras de CFU-GM y de células CD34+/33- recolectadas por aféresis y por volemia procesada.

	Total recolectado		Total recolectado por sesión de aféresis		Total recolectado por volemia procesada	
	<i>Median</i> <i>a</i>	<i>Extremos</i>	<i>Median</i> <i>a</i>	<i>Extremos</i>	<i>Median</i> <i>a</i>	<i>Extremos</i>
CFU-GM (x $10^4/\text{kg}$)	4,8	0,2 ; 41,5	1,8	0,03-31,3	1,2	0,03 ; 10,9
CD34+/33- (x $10^6/\text{kg}$)	1,7	0,07 ; 11,3	0,7	0,02-5,6	0,4	0,02 ; 3

Tabla 7 – CFU-GM y células CD34+/33- recolectadas por sesión de aféresis y por volemia procesada.

Los días en que se consiguió una recolección más efectiva fueron el 4º, 5º y 6º desde el comienzo de la movilización (Fig. 9). Al interpretar la figura es preciso tener en cuenta que sólo en un número reducido de pacientes (seis) se inició la recolección el cuarto día. En realidad, la recolección del 4º día fue superior a la del 5º en sólo 2 de estos 6 pacientes. En el 90% de los casos, el 5º día fue el de mayor recolección de células CD34+/33-.

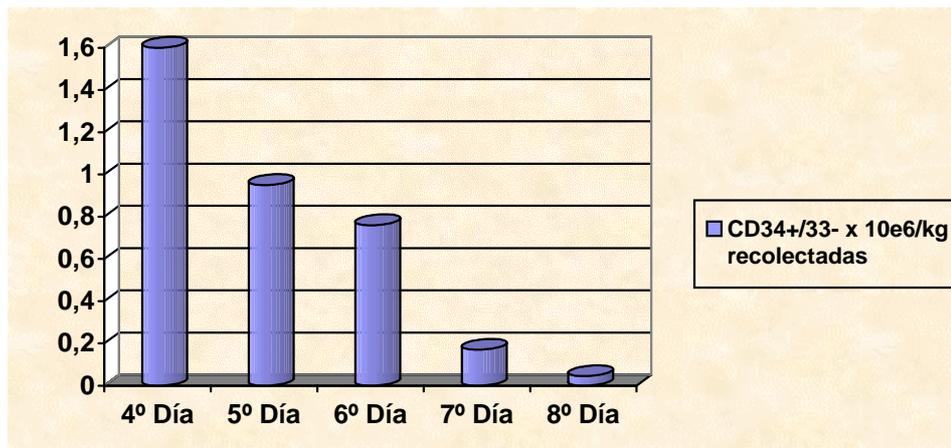


Figura 9 – Mediana de células CD34+/33- recolectadas según el día de movilización. Es preciso tener en cuenta que sólo seis pacientes –escogidos por su buena respuesta movilizador– iniciaron las aféresis el día 4 (ver texto).

2.3 - Injerto hematopoyético

Del total de 211 trasplantes, 207 llegaron a recuperar una cifra superior a $0,5 \times 10^9/l$ neutrófilos. Los 4 pacientes restantes (1,9% del total) fallecieron durante la aplasia, dos en el día +5 y dos en el día +8, por motivos atribuibles a la toxicidad del procedimiento (sepsis y toxicidad orgánica de la quimioterapia a alta dosis). Un total de 11 pacientes (5,2% del total) no llegaron a recuperar una cifra de plaquetas establemente superior a $20 \times 10^9/l$. Cuatro de ellos fueron los pacientes que

tampoco llegaron a recuperar los neutrófilos. Los restantes fallecieron en los días +12, +20, +21, +22, +23, +30, +60 y +154. Sólo uno de ellos falleció por hemorragia.

La mediana actuarial de días postrasplante hasta la recuperación de $0,5 \times 10^9/l$ neutrófilos fue de 10 (IC 95%: 10-10). Ningún paciente alcanzó esta recuperación antes del día +8. Al cumplirse la segunda semana postrasplante en el 87% de los pacientes vivos se había producido el injerto granulocítico. Para el día +21 más del 99% habían recuperado la cifra de neutrófilos. El paciente que más tiempo tardó alcanzó el injerto el día +26. La Figura 10 muestra la curva actuarial de recuperación granulocítica.

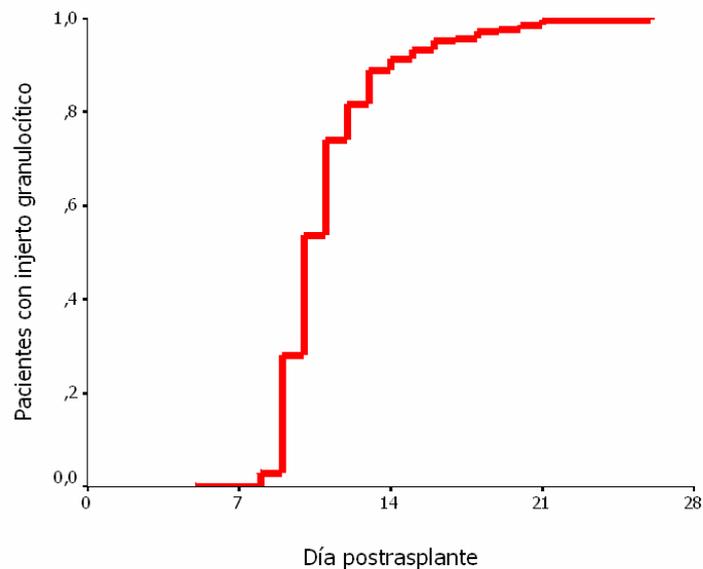


Figura 10 – Cinética actuarial de recuperación granulocítica. El eje de ordenadas indica (en tanto por uno) la proporción de pacientes que han llegado a recuperar la cifra de $0,5 \times 10^9/l$ granulocitos.

La mediana de recuperación plaquetar fue de 12 días (IC 95%: 11-13). Ningún paciente la alcanzó antes del día +7. En términos actuariales, a las dos

semanas presentaba más de $20 \times 10^9/l$ plaquetas el 73% de los pacientes, y al cabo de 21 días, el 87%. Hubo dos pacientes que alcanzaron la recuperación plaquetaria en los días +180 y +203 postrasplante. La Figura 11 muestra la cinética de recuperación plaquetaria.

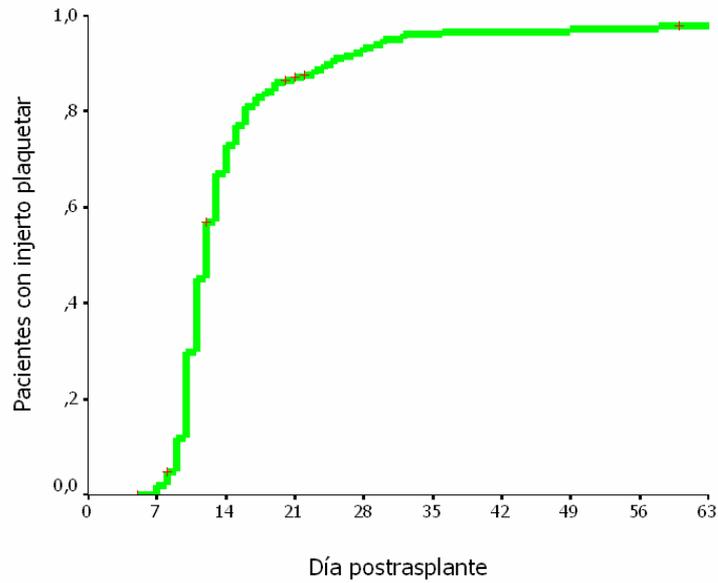


Figura 11 – Cinética actuarial de recuperación plaquetar. El eje de ordenadas indica (en tanto por uno) la proporción de pacientes que han llegado a recuperar la cifra de $20 \times 10^9/l$ plaquetas de forma estable y con independencia de las transfusiones

Todos los pacientes de la serie requirieron alguna transfusión durante el trasplante. La mediana de unidades de hematíes transfundidos fue de 4 (1-38; RIC: 4) y la de transfusiones de plaquetas fue de 6 (1-58).

3 – FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE EL INJERTO HEMATOPOYÉTICO

3.1 – Factores con influencia sobre la recuperación granulocítica

La Tabla 8 resume el análisis de la influencia de los 37 factores estudiados sobre el tiempo de recuperación granulocítica en la serie completa de trasplantes. Como se puede apreciar, cuatro variables mostraron influencia significativa tras el análisis multivariante con un modelo de riesgos proporcionales: el diagnóstico (cáncer de mama frente a los demás), la presencia de enfermedad extramedular activa en el momento del trasplante y los números de células CD34+/33- y de CFU-GM en el producto infundido. Junto a ellos, la utilización de algún factor de crecimiento postrasplante mostró una influencia cercana a la significación.

La Tabla 9 resume el resultado final del mismo análisis aplicado a los tres subgrupos diagnósticos (omitiendo los resultados del univariante por cuestiones de espacio). En las pacientes con cáncer de mama hubo dos variables con influencia independiente: la cifra de células CD34+/33- infundidas y el régimen de acondicionamiento utilizado (STAMP-V contra cualquier nivel de escalada de dosis). Es preciso recordar que en este subgrupo todas las pacientes recibieron factor de crecimiento postrasplante, y por tanto dicha variable no pudo ser incluida en el análisis. En los pacientes con linfoma, la dosis de células mononucleares y la administración de algún factor de crecimiento resultaron significativas en el estudio multivariante. Por último, en los pacientes con mieloma las dos variables con influencia independiente fueron la dosis de células CD34+/33- y la administración de factores de crecimiento.

VARIABLES ESTUDIADAS	SIGNIFICACIÓN EN	VARIABLES SIGNIFICATIVAS EN EL ANÁLISIS MULTIVARIANTE
----------------------	------------------	---

	EL UNI-VARIANTE	P	RR	IC 95%
Diagnóstico	+	0,018*	2	1,12 ; 3,6
Edad	-			
Volemia	+			
Grupo sanguíneo ABO	-			
Líneas de tratamiento previas	+			
Ciclos de tratamiento recibidos	+			
Radioterapia previa	+			
Medula ósea previa	+			
Medula ósea pretrasplante	+			
Enfermedad extramedular pretraspl.	+	0,002	0,49	0,31 ; 0,77
Remisión completa pretrasplante	+			
Número de aféresis	+			
Aféresis problemática	-			
Régimen de acondicionamiento	+			
Leucocitos basales	-			
Plaquetas basales	+			
CD34+/33- en SP basal	-			
% de CD34+/33- en SP basal	-			
Incremento de leuc. con la movilización	+			
Incremento de plq con la movilización	-			
Incremento de CD34+/33- en SP	+			
Incremento del % de CD34+/33-	+			
Leucocitos el 5º día de movilización	+			
Plaquetas el 5º día de movilización	-			
CD34+/33- en SP el 5º día de movilización	+			
% de CD34+/33- el 5º día de mov.	+			
Cifra máxima de CD34+/33- en SP	+			
Día de máxima movilización	-			
Células totales infundidas	-			
% de CMN (micro) en el producto	+			
CMN (microscopio) infundidas	-			
% de CMN (autom.) en el producto	-			
CMN (automático) infundidas	-			
CFU-GM infundidas	+	0,006	1,04	1,01 ; 1,07
% de CD34+/33- en el producto	+			
CD34+/33- infundidas	+	< 0,00005	1,28	1,14 ; 1,44
Uso de algún CSF postrasplante	+	0,085		

Tabla 8 – Influencia de las distintas variables sobre el injerto granulocítico en el grupo global de trasplantes. + : P < 0,05 - : P > 0,1 +/- : 0,05 ≤ P ≤ 0,1 * El contraste significativo fue el que enfrentaba cáncer de mama frente al resto de los diagnósticos.

SUBGRUPO DIAGNÓSTICO	VARIABLES SIGNIFICATIVAS EN EL MULTIVARIANTE	P	RR	IC 95%
MAMA	CD34+/33-	< 0,00005	1,4	1,23 ; 1,59
	Acondicionamiento*	0,012	2,14	1,18 ; 3,87
LINFOMA	CMN	0,0009	1,36	1,14 ; 1,63
	CSF postrasplante	0,023	11,17	1,4 ; 89,2
MIELOMA	CD34+/33-	0,004	1,95	1,23 ; 3,07
	CSF postrasplante	0,052	8	0,98 ; 65,3

Tabla 9 – Variables con influencia significativa en el análisis multivariante aplicado a los tres subgrupos diagnósticos.

+ : P < 0,05 - : P > 0,1 +/- : 0,05 ≤ P ≤ 0,1

* STAMP-V vs. cualquier nivel de escalada de dosis.

3.2 – Factores con influencia sobre la recuperación de plaquetas

El resultado de los análisis uni y multivariante realizados en el total de trasplantes se resumen en la Tabla 10. Hasta 24 variables mostraron resultados significativos o cercanos a la significación en el análisis univariante. Tras el análisis de riesgos proporcionales, tres de ellas mostraron una influencia independiente: la dosis de células CD34+/33- infundidas, la consecución de una remisión completa antes del trasplante y el número de líneas de tratamiento recibidas. La dosis de CMN mostró una influencia cercana a la significación estadística.

VARIABLES ESTUDIADAS	SIGNIFICACIÓN EN EL UNIVARIANTE	VARIABLES SIGNIFICATIVAS EN EL ANÁLISIS MULTIVARIANTE
----------------------	---------------------------------	---

		P	RR	IC 95%
Diagnóstico	+			
Edad	-			
Volemia	-			
Grupo sanguíneo ABO	-			
Líneas de tratamiento previas	+	0,03	0,75	0,57 ; 0,97
Ciclos de tratamiento recibidos	+			
Radioterapia previa	+/-			
Medula ósea previa	+			
Medula ósea pretrasplante	+			
Enfermedad extramedular pretraspl.	+			
Remisión completa pretrasplante	+	0,018	2,11	1,32 ; 3,37
Número de aféresis	+			
Aféresis problemática	-			
Régimen de acondicionamiento	+			
Leucocitos basales	+/-			
Plaquetas basales	+			
CD34+/33- en SP basal	-			
% de CD34+/33- en SP basal	-			
Incremento de leuc. con la movilización	+/-			
Incremento de plq. con la movilización	-			
Incremento de CD34+/33- en SP	+			
Incremento del % de CD34+/33-	+			
Leucocitos el 5º día de movilización	-			
Plaquetas el 5º día de movilización	+			
CD34+/33- en SP el 5º día de moviliz.	+			
% de CD34+/33- el 5º día de moviliz.	+			
Cifra máxima de CD34+/33- en SP	+			
Día de máxima movilización	-			
Células totales infundidas	+			
% de CMN (micro) en el producto	-			
CMN (microscopio) infundidas	+	0,061		
% de CMN (autom.) en el producto	-			
CMN (automático) infundidas	-			
CFU-GM infundidas	+			
% de CD34+/33- en el producto	+			
CD34+ /33- infundidas	+	< 0,00005	1,4	1,27 ; 1,57
Uso de algún CSF postrasplante	+			

Tabla 10 – Influencia de las distintas variables sobre el tiempo de injerto plaquetar en el grupo global de trasplantes. + : P < 0,05 - : P > 0,1 +/- : 0,05 ≤ P ≤ 0,1

SUBGRUPO DIAGNÓSTICO	VARIABLES SIGNIFICATIVAS EN EL MULTIVARIANTE	P	RR	IC 95%
----------------------	--	---	----	--------

MAMA	Remisión completa pretrasplante	0,002	2,66	1,43 ; 4,96
	CD34+/33-	0,0024	1,28	1,09 ; 1,49
	CFU	0,036	1,04	1 ; 1,08
LINFOMA	CD34+/33-	0,0021	1,42	1,13 ; 1,77
MIELOMA	Edad	0,0037	0,85	0,76 ; 0,95
	CD34+/33-	0,004	1,86	1,22 ; 2,84

Tabla 11 - Variables con influencia significativa en el análisis multivariante aplicado a los tres subgrupos diagnósticos

El resultado del análisis estratificado según los tres grupos diagnósticos designados se resume en la Tabla 11.

La dosis infundida de células CD34+/CD33- mantiene su influencia independiente en cada uno de los grupos. Además de esta variable, en las pacientes con cáncer de mama presentan influencia independiente la

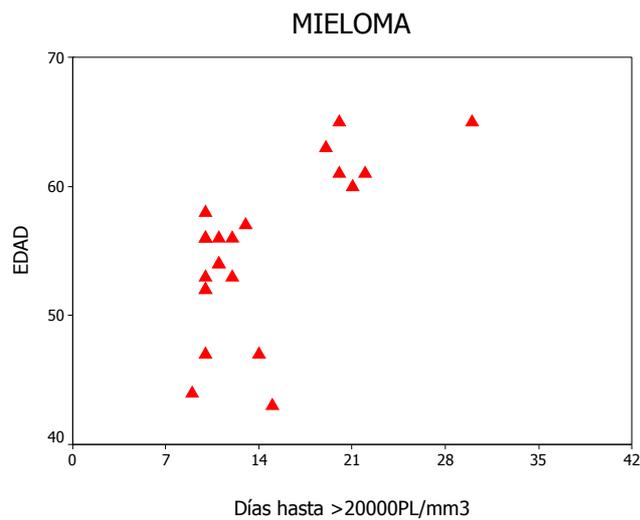


Figura 12 – Relación entre la edad y el injerto plaquetar en el subgrupo de pacientes con mieloma

obtención de una remisión completa (o situación de *no evidencia de enfermedad*) antes del trasplante y la dosis de CFU-GM infundidas. En los pacientes con mieloma la edad resultó un factor significativo en el retraso del injerto plaquetar (Fig. 12).

3.3 – Factores con influencia sobre las transfusiones de hematíes

En la Tabla 12 se presenta la influencia de las distintas variables sobre el número de concentrados de hematíes transfundidos. Dos variables presentaron significación estadística tras el estudio de regresión lineal múltiple: el número de ciclos de tratamiento recibidos con anterioridad y la infiltración medular en el momento del trasplante.

El mismo análisis practicado en el subgrupo de pacientes con cáncer de mama encontró influencia independiente de dos variables: la edad y el porcentaje de CMN determinado por medios automáticos. Hay que tener presente que la infiltración medular pretrasplante no pudo ser valorada en este grupo ya que solamente fue demostrable en una paciente. En el estrato de pacientes con linfoma el único factor significativo fue la presencia de enfermedad extramedular pretrasplante. En el grupo de pacientes con mieloma, el número de ciclos recibidos resultó ser la única variable con significación estadística.

VARIABLES ESTUDIADAS	SIGNIFICACIÓN EN EL UNIVARIANTE	VARIABLES SIGNIFICATIVAS EN EL ANÁLISIS MULTIVARIANTE		
		P	B*	IC 95%
Diagnóstico	-			
Edad	-			
Volemia	-			
Grupo sanguíneo ABO	-			
Líneas de tratamiento previas	-			
Ciclos de tratamiento recibidos	+	0,001	0,23	0,09 ; 0,36
Radioterapia previa	-			
Medula ósea previa	-			
Medula ósea pretrasplante	+	0,008	-2,9**	-5,05 ; -0,77**
Enfermedad extramedular pretraspl.	+/-	0,077		
Remisión completa pretrasplante	+			
Número de aféresis	+			
Aféresis problemática	-			
Régimen de acondicionamiento	+			
Leucocitos basales	-			
Plaquetas basales	+/-			
CD34+/33- en SP basal	-			
% de CD34+/33- en SP basal	-			
Incremento de leuc. con la moviliz.	+/-			
Incremento de plq. con la moviliz.	-			
Incremento de CD34+/33- en SP	+/-			
Incremento del % de CD34+/33-	-			
Leucocitos el 5º día de movilización	+/-			
Plaquetas el 5º día de movilización	-			
CD34+/33- en SP el 5º día de mov.	-			
% de CD34+/33- el 5º día de mov.	-			
Cifra máxima de CD34+/33- en SP	-			
Día de máxima movilización	-			
Células totales infundidas	+/-			
% de CMN (micro) en el producto	-			
CMN (microscopio) infundidas	+/-			
% de CMN (autom.) en el producto	+			
CMN (automático) infundidas	-			
CFU-GM infundidas	-			
% de CD34+/33- en el producto	+/-			
CD34+/33- infundidas	+			
Uso de algún CSF postrasplante	+/-			

Tabla 12 – Influencia de las distintas variables sobre el consumo de concentrados de hematíes peritrasplante en el grupo global. + : P < 0,05 - : P > 0,1 ; +/- : 0,05 ≤ P ≤ 0,1 * B = Coeficiente de regresión no estandarizado ** La codificación de la variable era: 1=sí; 2=no. Por ello, un coeficiente negativo indica menor consumo de hematíes en los pacientes con médula no infiltrada

3.4 – Factores con influencia sobre las transfusiones de plaquetas

La Tabla 13 muestra el análisis de la influencia de las distintas variables sobre el número de transfusiones de plaquetas necesarias durante el trasplante. Hasta 22 variables mostraron influencia significativa o cercana a la significación estadística en el análisis univariante. El estudio multivariante definió dos parámetros con influencia independiente: el estatus de remisión completa pretrasplante y el recuento de plaquetas en sangre periférica el quinto día de movilización.

El análisis estratificado mostró influencia significativa de la remisión completa en el grupo de pacientes con cáncer de mama y de las dosis de células totales y de células CD34+/33- infundidas en el grupo de linfoma. Ninguna variable alcanzó significación estadística en el análisis de la subpoblación de pacientes con mieloma múltiple.

VARIABLES ESTUDIADAS	SIGNIFICACIÓN EN EL UNIVARIANTE	VARIABLES SIGNIFICATIVAS EN EL ANÁLISIS MULTIVARIANTE		
		P	B*	IC 95%
Diagnóstico	-			
Edad	-			
Volemia	-			
Grupo sanguíneo ABO	-			
Líneas de tratamiento previas	+			
Ciclos de tratamiento recibidos	-			
Radioterapia previa	+/-			
Medula ósea previa	-			
Medula ósea pretrasplante	+/-			
Enfermedad extramedular pretraspl.	+			
Remisión completa pretrasplante	+	0,009	4,52**	1,15 ; 7,89
Número de aféresis	-			
Aféresis problemática	+/-			
Régimen de acondicionamiento	+/-			
Leucocitos basales	-			
Plaquetas basales	+			
CD34+/33- en SP basal	-			
% de CD34+/33- en SP basal	+/-			
Incremento de leuc. con la movilización.	+/-			
Incremento de plq. con la movilización.	-			
Incremento de CD34+/33- en SP	+			
Incremento del % de CD34+/33-	+			
Leucocitos el 5º día de movilización	-			
Plaquetas el 5º día de movilización***	+	0,009	-0,033	-0,06 ; -0,008
CD34+/33- en SP el 5º día de mov.	+			
% de CD34+/33- el 5º día de mov.	+/-			
Cifra máxima de CD34+/33- en SP	+			
Día de máxima movilización	-			
Células totales infundidas	+			
% de CMN (micro) en el producto	-			
CMN (microscopio) infundidas	+			
% de CMN (autom.) en el producto	+/-			
CMN (automático) infundidas	+/-			
CFU-GM infundidas	+			
% de CD34+/33- en el producto	+			
CD34+/33- infundidas	+			
Uso de algún CSF postrasplante	-			

Tabla 13 – Influencia de las variables sobre el número de transfusiones de plaquetas (grupo global). + : P < 0,05 - : P > 0,1 +/- : 0,05 ≤ P ≤ 0,1 * B = Coeficiente de regresión no estandarizado para la variable ** La codificación de la variable era: 1=sí; 2=no. Un coeficiente positivo indica menos transfusiones en los pacientes en remisión *** x 10⁹/l (de ahí el bajo valor absoluto del coeficiente de regresión)

4- ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS ESTIMADORES DE CALIDAD DEL PRODUCTO CELULAR TRASPLANTADO

Se han analizado cinco variables distintas que pretenden estimar el número de PH trasplantados: las CT, las CMN medidas al microscopio, las CMN medidas con el contador automático H1, las células CD34+/33- medidas por citometría de flujo y las CFU-GM. En este apartado se analizará en primer lugar la correlación entre estas diferentes mediciones. A continuación, se estudia la correlación de cada una de ellas con los tiempos de injerto granulocítico y plaquetar. Por último, se realiza un estudio comparativo de la cinética de injerto entre grupos separados según la cifra de células CD34+/33- infundidas.

4.1 – Correlación entre los distintos estimadores

La Figura 13 representa la relación entre las distintas variables que pretenden reflejar la cantidad de PH transplantados. El número de células totales presenta una elevada correlación con los recuentos de CMN, especialmente con el realizado a partir del contaje diferencial microscópico ($R_s = 0,94$ y $R_s = 0,8$ para los recuentos microscópico y automático, respectivamente) (Figuras 13-A y 13-B). La correlación entre ambos recuentos de CMN es de 0,86 (Figura 13-C).

Ni el número de CT ni el de CMN estimado por cualquiera de los dos métodos presentan una correlación significativa con la cifra de células CD34+/33-. Los coeficientes de correlación muestran un valor absoluto inferior a 0,15 en los tres casos (Figuras 13-C, 13-F y 13-H). La correlación entre aquellos tres parámetros y el recuento de CFU-GM es igualmente baja, siendo tan sólo marginalmente significativa la de las CT, a pesar del elevado tamaño muestral (Figuras 13-D, 13-G y 13-I).

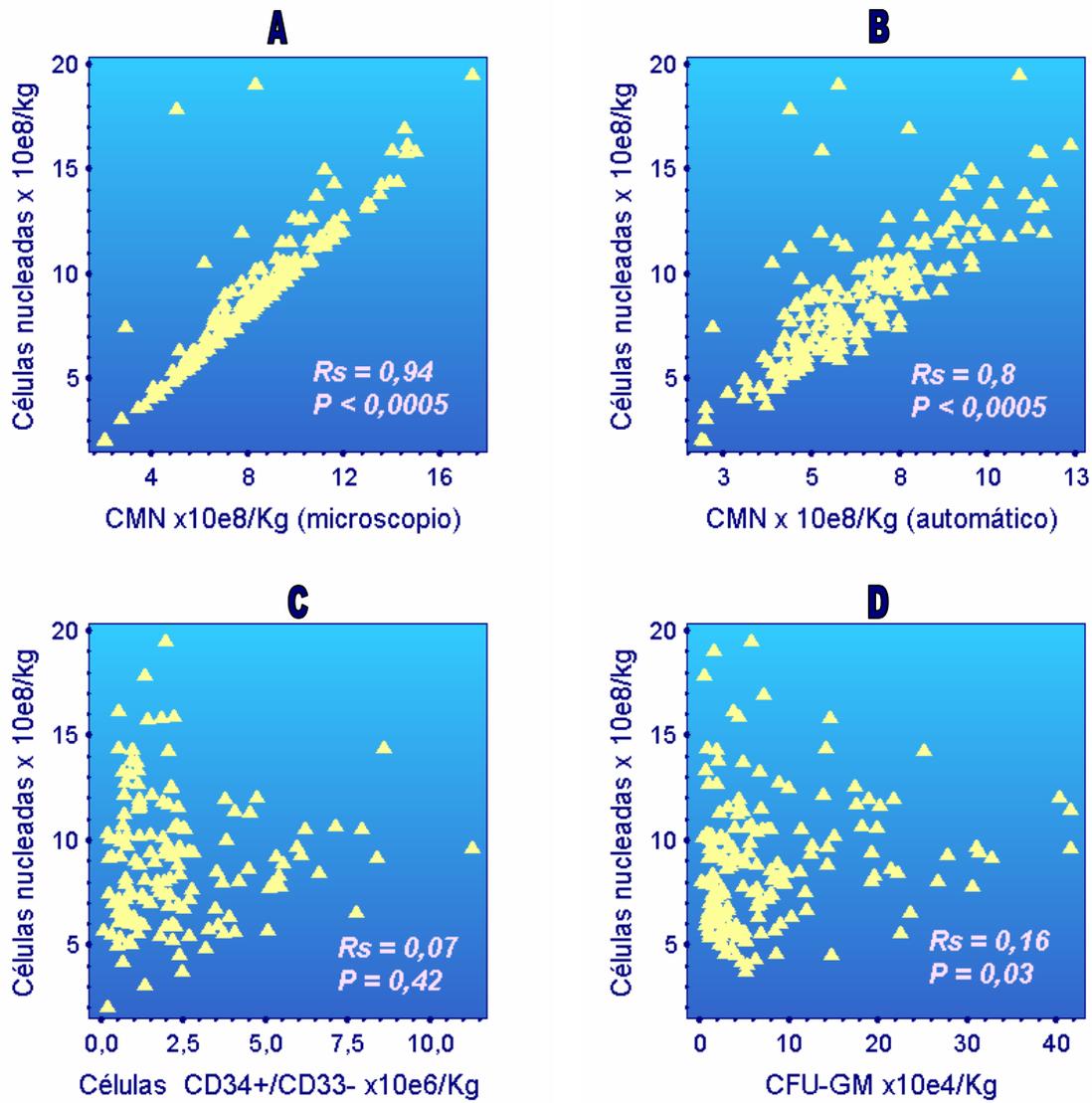
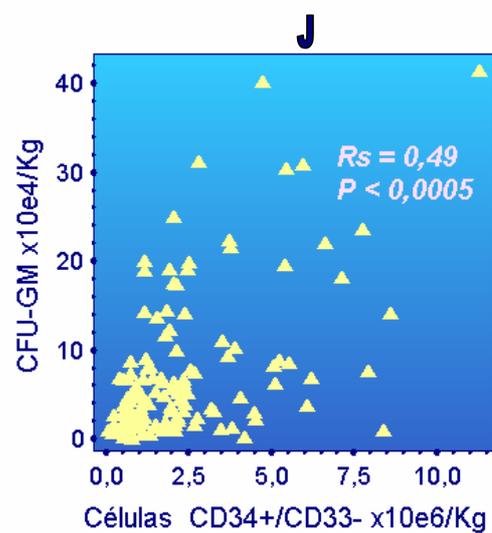
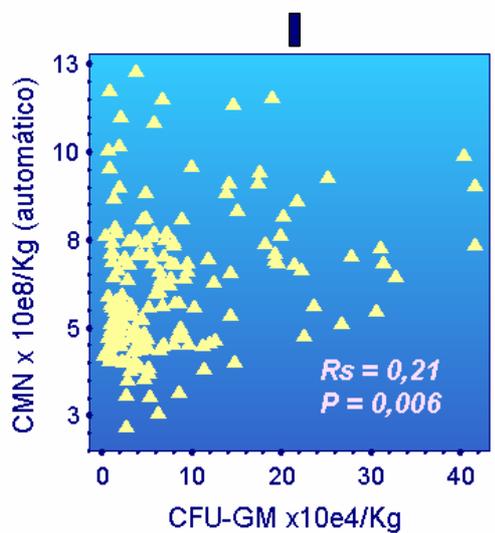
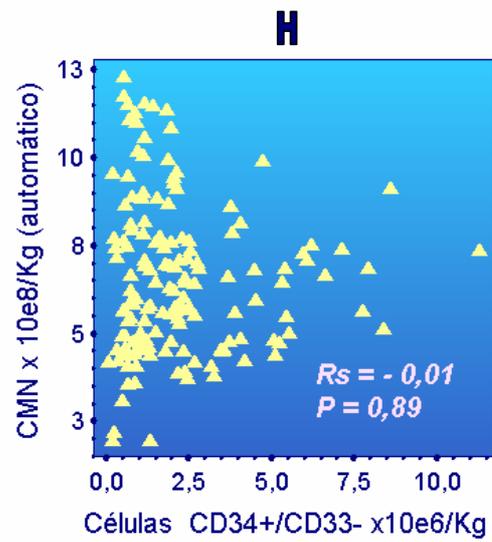
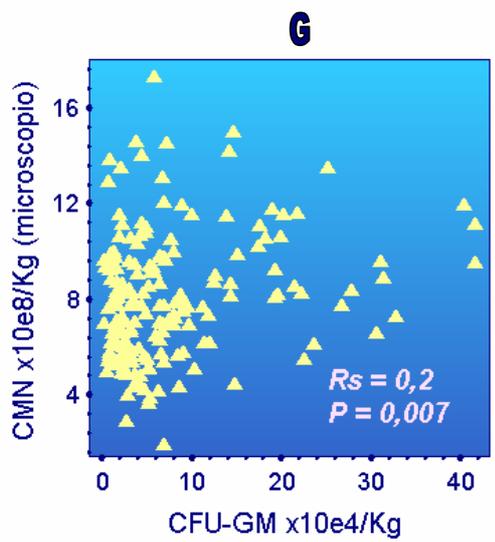
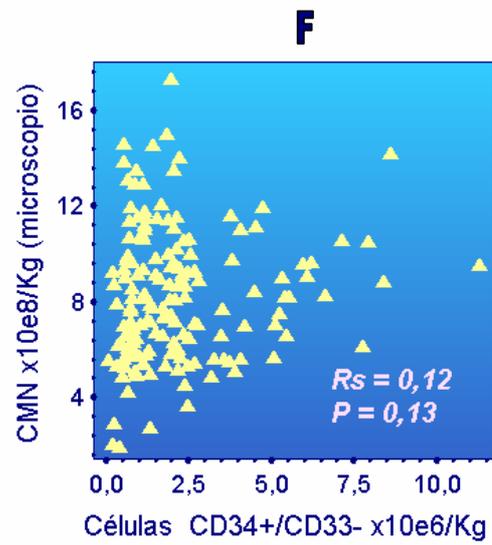
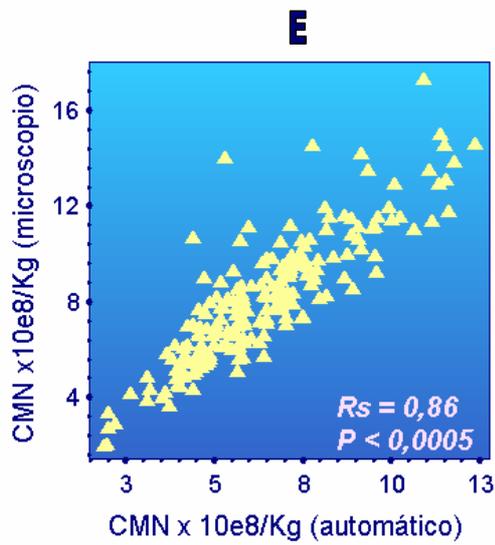


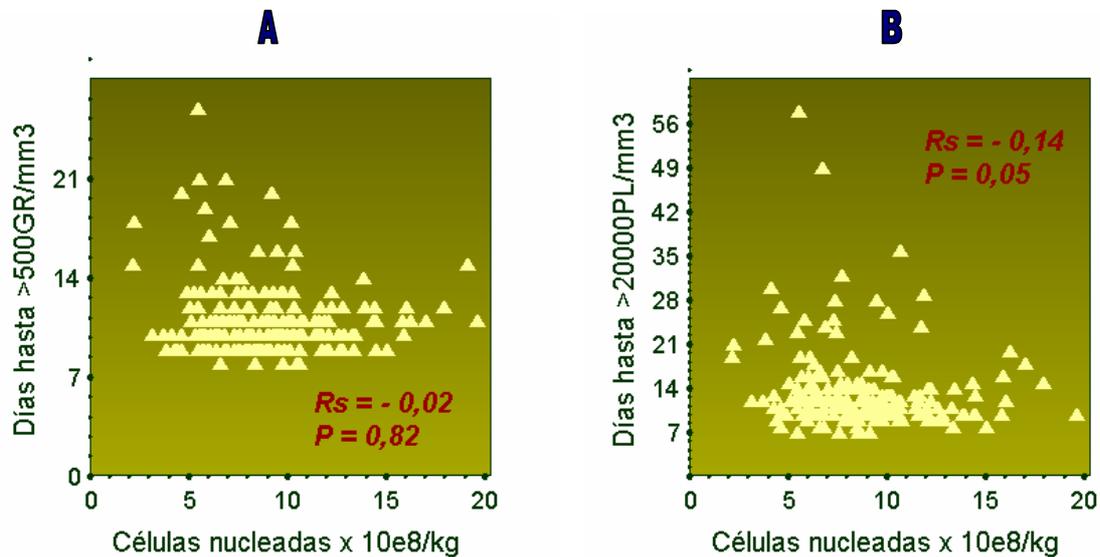
Figura 13– Diagramas de dispersión y correlaciones no paramétricas entre los distintos estimadores del número de células progenitoras. R_s : coeficiente de correlación por rangos de Spearman
A-D: sobre estas líneas; E-J: página siguiente



Por su parte, el recuento de células CD34+/33- y el de CFU-GM sí que muestran una correlación altamente significativa entre sí, con un coeficiente de correlación por rangos de 0,49 (Fig. 13-J).

4.2 – Correlación de los estimadores con la cinética de injerto

La Figura 14 ilustra la relación entre los recuentos de CT y CMN y los tiempos de recuperación de granulocitos y plaquetas postrasplante. Es posible apreciar cómo la correlación entre estos parámetros es pobre, con un valor absoluto del coeficiente R_s igual o inferior a 0,15 en todos los casos. El coeficiente R_s tiene valor negativo, indicando que números mayores de células se relacionan con menos días de injerto, pero sólo en el caso de la recuperación plaquetar estas relaciones alcanzan o se aproximan al umbral de significación estadística. La correlación con el consumo de concentrados de hemáties no es significativa en ninguno de los casos, con R_s de $-0,13$ para las CT, $-0,14$ para las CMN microscópicas y $-0,02$ para el recuento automático de CMN. La relación con el número de transfusiones de plaquetas necesarias sólo es discretamente mejor, con un R_s de $-0,14$ ($P = 0,04$) para las CT, de $-0,14$ ($P = 0,05$) para las CMN y de $-0,12$ ($P = 0,09$) para las CMN microscópicas.



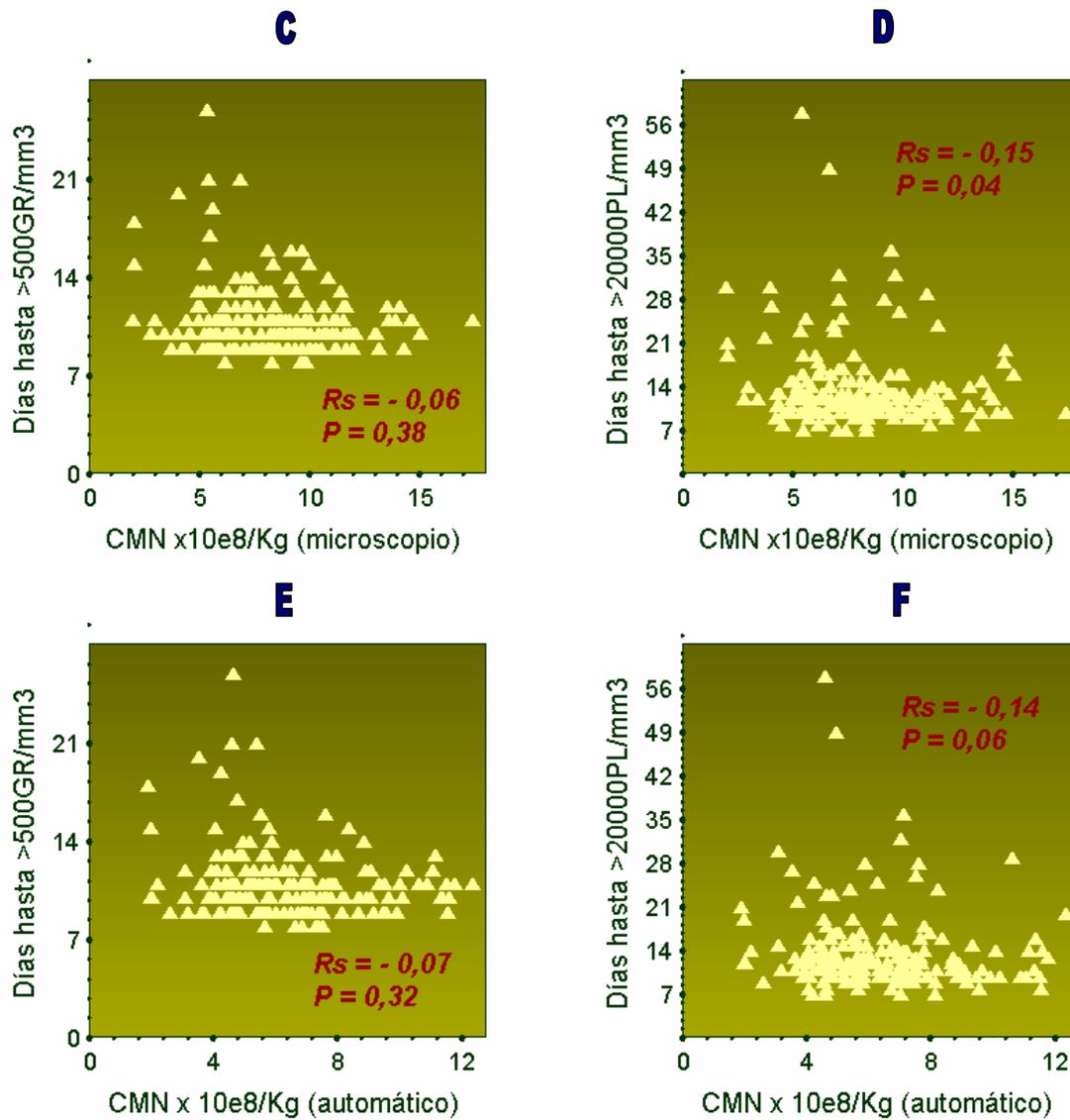


Figura 14 – Diagramas de dispersión y correlaciones no paramétricas entre los números de células totales, células mononucleares estimadas al microscopio y células mononucleares estimadas de forma automática y los días hasta la consecución del injerto de granulocitos y plaquetas. Los pacientes que fallecen sin llegar a este injerto han sido excluidos de este análisis. R_s : coeficiente de correlación por rangos de Spearman

En contraste, la relación entre la cifra de células CD34+/33- y el tiempo de injerto granulocítico y plaquetar sí que es altamente significativa ($P < 0,0005$), con

unos coeficientes de correlación por rangos de $-0,58$ y $-0,57$ respectivamente (Figuras 15-A y 15-B). En la parte A de la figura se puede apreciar con claridad cómo todos los pacientes que tardan más de dos semanas en alcanzar el injerto granulocítico se han trasplantado con dosis inferiores a $2 \times 10^6/\text{kg}$ células CD34+/33-, o como todos aquellos que injertan el día +8 (el día en que se produjeron los injertos más precoces) han sido trasplantados con más de $5 \times 10^6/\text{kg}$. En el diagrama de recuperación plaquetar (Fig. 15-B) se aprecia cómo ningún paciente trasplantado con más de $3 \times 10^6/\text{kg}$ células CD34+/33- tarda más de 14 días en recuperar la cifra de plaquetas. Algunos puntos que se destacan por mostrar una recuperación de plaquetas tardía (mayor de tres semanas) en pacientes trasplantados con dosis de CD34 superiores a $1,5 \times 10^6/\text{kg}$ se explican por circunstancias clínicas de elevado consumo periférico de plaquetas, como es el caso de una paciente con enfermedad veno-oclusiva hepática y de otra con un neumonía por cándida.

Como se puede apreciar en la Figura 15, las relaciones entre la cifra de células CD34+/33- y los tiempos de injerto no son lineales. Si se intenta construir una ecuación de regresión, modelos no lineales como el potencial o el logarítmico presentan coeficientes de determinación (R^2) superiores al del modelo lineal. La transformación logarítmica de las variables es capaz de linealizar sensiblemente la relación y de aumentar el coeficiente de correlación de Pearson. Sin embargo, el coeficiente de correlación por rangos de Spearman que hemos utilizado es más resistente a la falta de linealidad y no se modifica con las transformaciones.

La cifra de células CD34+/33- también correlaciona significativamente con el consumo de concentrado de hematíes ($R_s = -0,19$; $P = 0,02$) y el número de transfusiones de plaquetas ($R_s = -0,3$; $P < 0,0005$).

El número de CFU-GM infundidas presenta asimismo una alta correlación con los tiempos de injerto (Fig. 16) así como con las transfusiones de plaquetas ($R_s = -0,26$; $P < 0,0005$), pero no así con el consumo de hematíes ($R_s = -0,03$; $P = 0,67$).

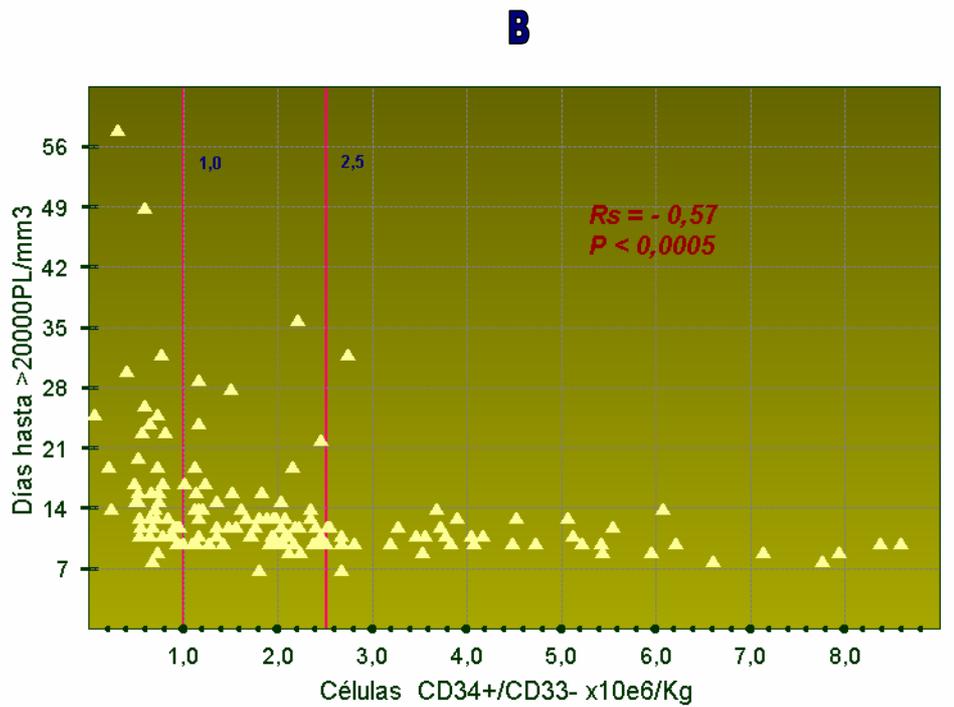
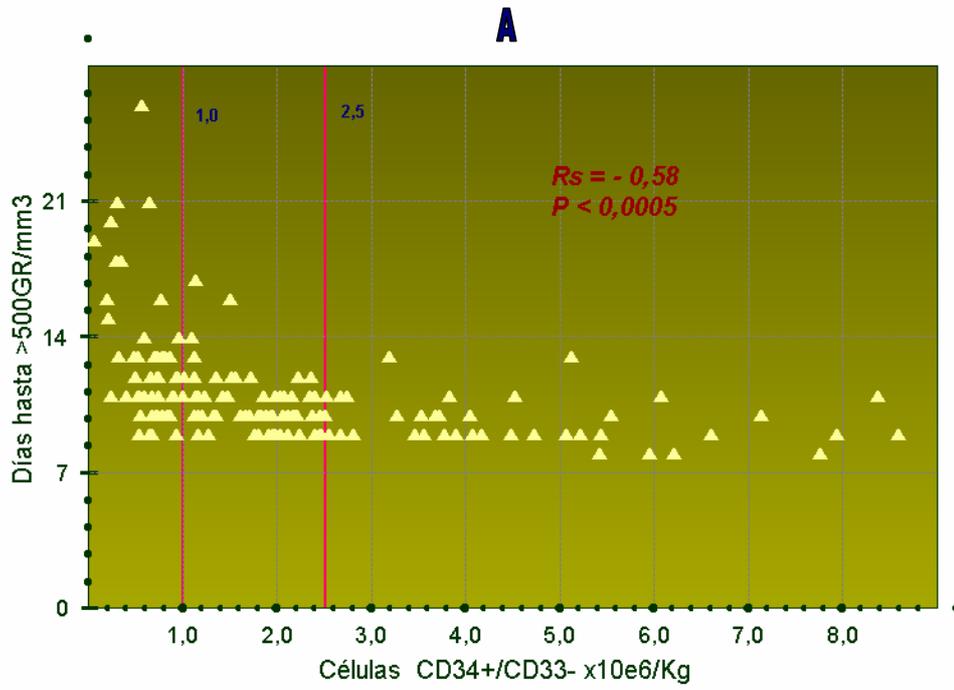
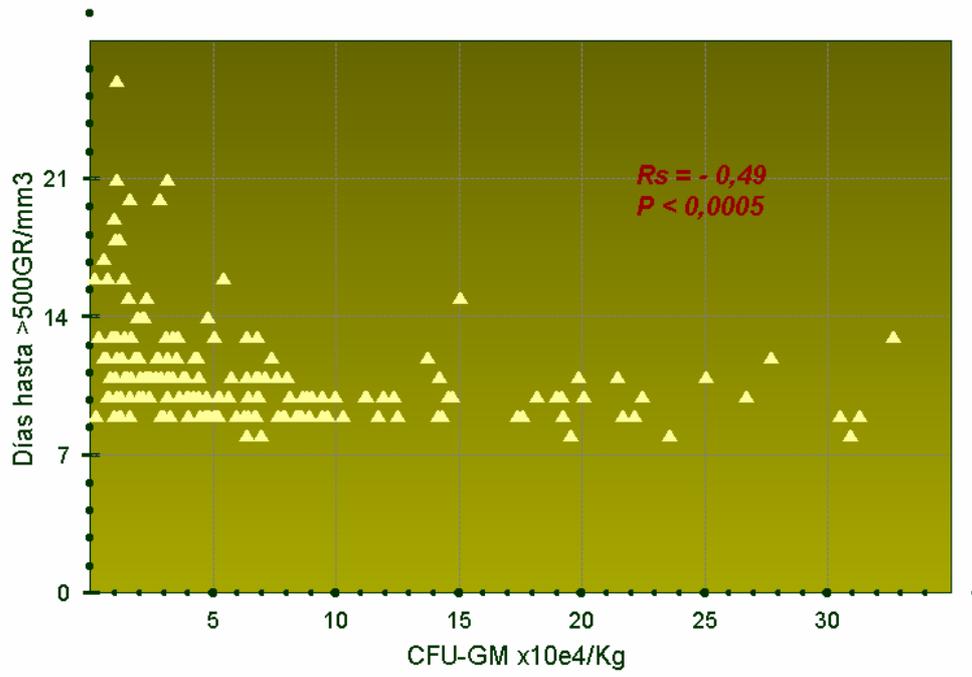


Figura 15 – Relación entre la cifra de células CD34+/33- trasplantadas y el tiempo hasta el injerto granulocítico (A) y plaquetar (B). Las líneas de referencia separan los tres grupos analizados actuarialmente en el apartado 4.3.

A



B

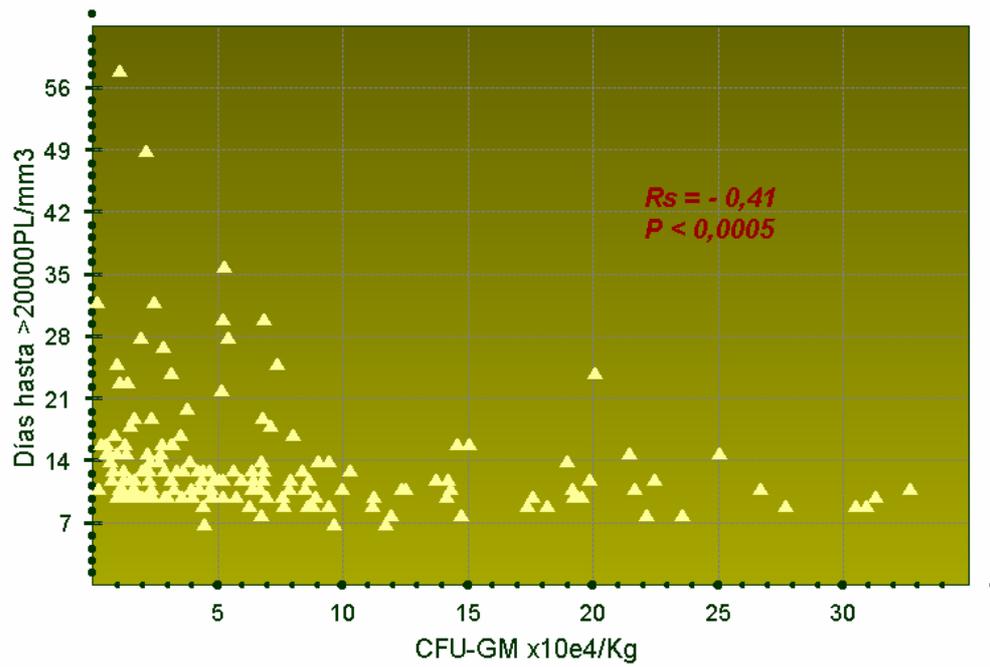


Figura 16 – Relación entre la cifra de CFU-GM trasplantadas y los tiempos de injerto granulocítico (A) y plaquetar (B).

4.3 – Injerto hematopoyético según el nivel de CD34+/33-

Con objeto de profundizar en la relación entre la cifra de células CD34+/33- y el tiempo de injerto, se ha dividido la muestra en primera instancia según los percentiles 20, 40, 60 y 80 de este parámetro. En la Tabla 14 se resumen los datos del injerto hematopoyético en los cinco grupos. Es posible apreciar cómo los tiempos de injerto disminuyen a medida que aumenta la cifra de células CD34+/33- infundidas. El número de transfusiones de plaquetas es superior en los grupos con las cifras más bajas de CD34+/33-, con unas medianas de 10, 7, 5, 5 y 6 unidades por trasplante. En contraste, la mediana de unidades de hematíes transfundidas fue de 4 en todos los grupos a excepción del último (> 3,49 CD34+/33-), en que resultó 3,5.

CD34+/33-	N	Fallecidos preinjerto	Días hasta GR > 0,5 x 10 ⁹ /l		Días hasta PLQ > 20 X 10 ⁹ /l	
			Mediana	Extremos	Mediana	Extremos
≤ 0,74	32	5	11,5	9 – 26	16	8 – 58
0,75 – 1,24	31	0	11	9 – 17	12,5	10 – 32
1,25 – 2,06	31	1	10	9 – 16	12	7 – 28
2,07 – 3,49	31	2	10	9 – 13	11	7 – 36
> 3,49	31	1	9	8 – 13	10	8 – 14
Desconocido	55	2	11	8 – 20	12	7 - 203

Tabla 14 – Tiempo de injerto hematopoyético y número de pacientes que fallecen antes del injerto completo según el nivel de células CD34+/33- trasplantadas. Se ha dividido la muestra en cinco grupos iguales según los percentiles 20, 40, 60 y 80 de la cifra de CD34+/33-. Un sexto grupo muestra los resultados en los casos en que la cifra de células CD34+/33- no se determinó (primeros casos de la serie de trasplante, antes de que esta técnica estuviera disponible).

Más allá de la diferencia en los tiempos de recuperación, el número de pacientes que fallecen por distintas causas antes de lograr el injerto leucoplaquetar

completo es sensiblemente mayor en los que reciben dosis bajas de CD34+/33- (Tabla 14). En este grupo la mortalidad preinjerto alcanza el 16% de los pacientes mientras en los demás grupos oscila entre el 0 y el 6%.

Se ha realizado una segunda división de la serie de trasplantes según el nivel de células CD34+/33-, esta vez tratando de buscar unos umbrales "redondos", traducibles a la práctica clínica diaria en forma de recomendaciones sobre la meta a alcanzar en la fase de recolección. Así, hemos establecido tres grupos: el de aquellos pacientes que reciben $1 \times 10^6/\text{kg}$ células CD34+/33- o menos, el de los que reciben entre 1 y $2,5 \times 10^6/\text{kg}$ y el de aquellos trasplantados con una dosis mayor de 2,5 millones. Estos grupos comprenden 49, 66 y 41 trasplantes respectivamente. Las Figuras 17 y 18 representan las cinéticas actuariales de recuperación granulocítica y plaquetar respectivamente en cada uno de los tres grupos.

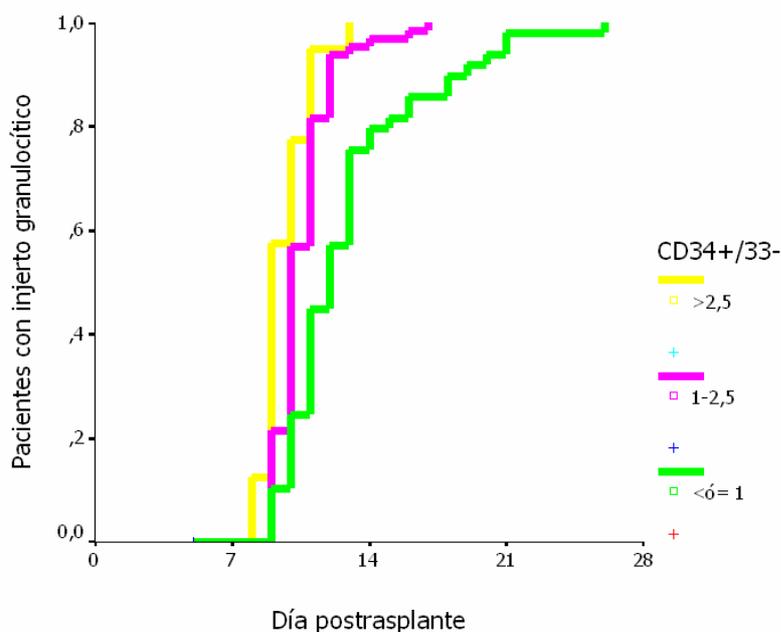


Figura 17 – Curva actuarial de recuperación granulocítica en tres grupos de pacientes diferenciados según la dosis de células CD34+/33- recibida. Todos los contrastes entre los subgrupos son altamente significativos (ver texto)

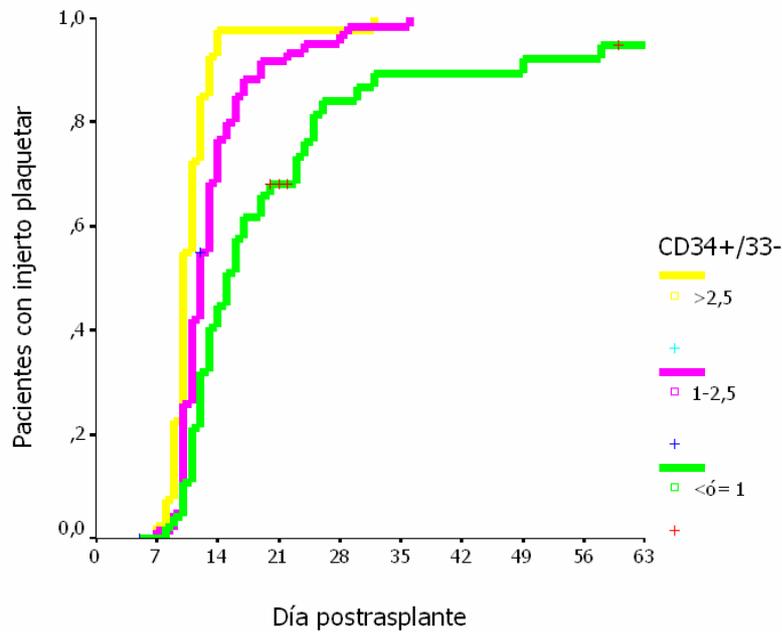


Figura 18 – Curva actuarial de recuperación plaquetar en tres grupos de pacientes diferenciados según la dosis de células CD34+/33- recibida. Todos los contrastes entre los subgrupos son altamente significativos (ver texto)

La Tabla 15 muestra las medianas actuariales de recuperación granulocítica y plaquetar con sus intervalos de confianza del 95%. Todas las diferencias entre los tres grupos son altamente significativas. En lo referente al tiempo de injerto granulocítico, el contraste entre el grupo que recibe menos de $1 \times 10^6/\text{kg}$ (mediana: 12 días) y el que recibe entre 1 y 2,5 (mediana: 10 días) presenta una P inferior a 0,00005. El contraste entre este segundo grupo y el que recibe más de $2,5 \times 10^6/\text{kg}$ (mediana: 9 días) resulta en una P de 0,0009. La diferencia entre el tiempo de injerto plaquetar en el grupo que recibe menos de $1 \times 10^6/\text{kg}$ (mediana: 15 días) y el que recibe entre 1 y 2,5 (mediana: 12 días) arroja una P de 0,0002. Por último, el contraste entre este segundo grupo y el de mayor dosis de CD34+/33- (mediana: 10 días) resulta en una P de 0,0004.

CD34+/33-	N	Días hasta GR > 0,5 x 10 ⁹ /l		Días hasta PLQ > 20 X 10 ⁹ /l	
		Mediana actuarial	IC 95%	Mediana actuarial	IC 95%
≤ 1	49	12	11 – 13	15	13 – 17
1 – 2,5	66	10	10 – 10	12	11 – 13
> 2,5	41	9	9 - 9	10	10 - 10

Tabla 15 – Medianas actuariales de los días hasta el injerto granulocítico y plaquetar en tres grupos diferenciados según la dosis de células CD34+/33- infundida.

5 - INJERTO HEMATOPOYÉTICO EN PACIENTES TRASPLANTADOS CON BAJAS CANTIDADES DE CÉLULAS PROGENITORAS

En los análisis presentados más arriba las dosis de células CD34+/33- y de CFU-GM trasplantadas quedan definidas como los estimadores de calidad del producto celular más sólidos de entre los estudiados. Hemos querido identificar un grupo de pacientes que son trasplantados con un número extremadamente bajo de PH para analizar su cinética de injerto. Para ello, se ha definido el grupo de pacientes que reciben una dosis por debajo del percentil 10 de cualquiera de los dos parámetros. Como se mencionó anteriormente, esta serie de incluye las primeras experiencias de trasplante de PH de sangre periférica en nuestra institución, en una época en la que ninguno de estos dos parámetros se utilizaba para guiar la recolección (se utilizaban las CMN) y por tanto algunos pacientes recibieron dosis que hoy se considerarían muy bajas. El percentil 10 de la cifra de CD34+/33- se encontró en $0,54 \times 10^6/\text{kg}$, y el de CFU-GM en $1,1 \times 10^4/\text{kg}$.

Quedaron incluidos en este grupo un total de 29 pacientes con una mediana de 48,5 años de edad. Ocho padecían cáncer de mama, nueve mieloma múltiple, cinco linfoma no Hodgkin, cuatro linfoma de Hodgkin, uno leucemia aguda mieloblástica, una un sarcoma uterino y otra un Sarcoma de Ewing. Habían recibido una mediana de 2 líneas de tratamiento antes del trasplante. Sólo 13 de ellos (45%) estaban en remisión completa antes del trasplante, y 11 (38%) presentaban enfermedad extramedular en ese momento. Recibieron algún tipo de factor de crecimiento postrasplante 23 pacientes (79%). La mediana de CT infundidas fue de $8 \times 10^8/\text{kg}$, la de CMN de $6,5 \times 10^8/\text{kg}$, la de CFU-GM de $1 \times 10^4/\text{kg}$ (extremos: 0,17 – 6,9) y la de células CD34+/33- de $0,53 \times 10^6/\text{kg}$ (0,07 - 8,4).

La mediana actuarial de tiempo hasta la recuperación granulocítica fue de 12 días (IC 95%: 11; 13). A las dos semanas de la infusión, el 69% de los pacientes

habían alcanzado $0,5 \times 10^9/l$ granulocitos en SP, cifra que asciende hasta el 97% al final de la tercera semana (Fig. 19).

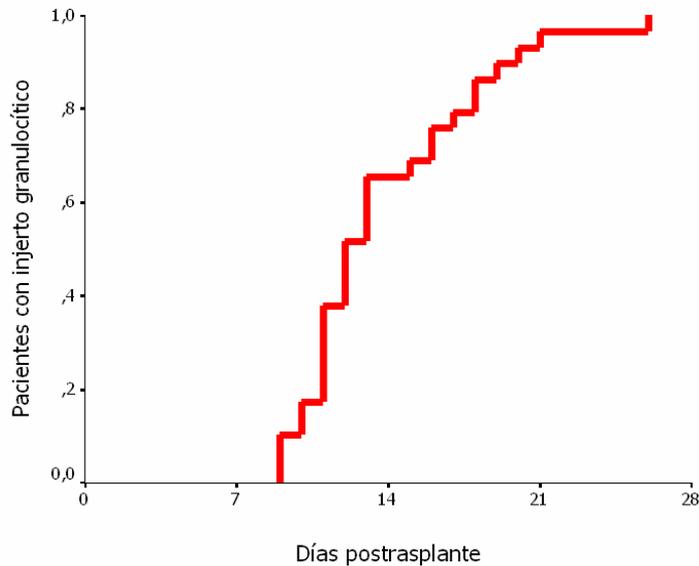


Figura 19 – Cinética actuarial de recuperación granulocítica en el grupo de pacientes que reciben dosis bajas de células progenitoras (por debajo del percentil 10 de CD34+/33- ó de CFU-GM).

La mediana de días hasta la recuperación plaquetar fue de 16 (IC 95%: 14; 18). A los 14 días de la infusión sólo el 35% de los pacientes de este grupo habían alcanzado el injerto plaquetar, a las 3 semanas, el 66% y al cabo de 4 semanas, el 76% (Fig. 20). Cinco pacientes de este grupo fallecieron antes de alcanzar el injerto plaquetar cuatro en los dos primeros meses postrasplante y el quinto en el día +154. Sólo en este último caso la causa del fallecimiento fue una complicación hemorrágica.

Los pacientes de este grupo requirieron una mediana de 10 transfusiones de plaquetas (extremos: 3-58) y de 4 unidades de concentrado de hemáties (extremos: 2-38).

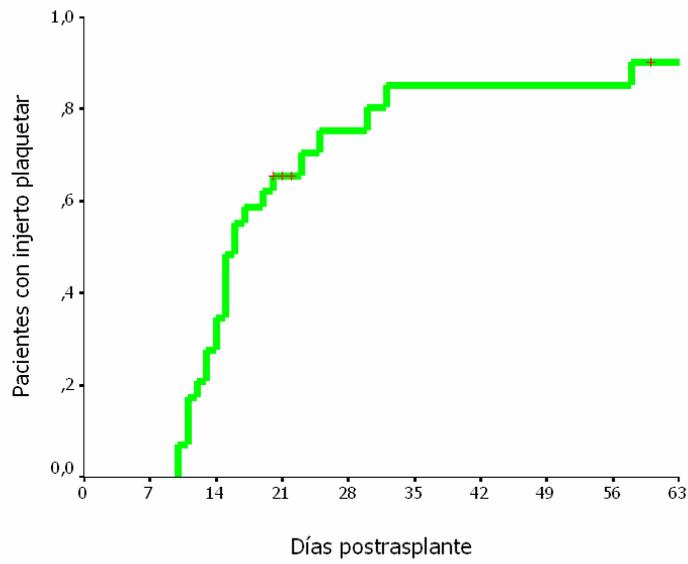


Figura 20 – Cinética actuarial de recuperación plaquetar en el grupo de pacientes que reciben dosis bajas de células progenitoras (por debajo del percentil 10 de CD34+/33- ó de CFU-GM).

6- MODELO PREDICTIVO DE LA RECOLECCIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

De los análisis anteriores se desprende que el número de células CD34+/33- es un importante parámetro a la hora de estimar el potencial de un producto de aféresis para posibilitar un injerto precoz. Una cifra adecuada de estas células garantiza la realización de un trasplante con una probabilidad remota de fallo del injerto, y es posible disponer de este dato en el curso de pocas horas. Por ello, el número de células CD34+/33- por kg de peso obtenidas es el estimador más apropiado de los analizados para guiar la recolección de PH mediante aféresis. En este apartado se explora la posibilidad de predecir el número de células CD34+/33- que es posible recolectar en una serie de leucoaféresis a partir de parámetros disponibles con anterioridad.

6.1 – Cálculo del modelo de regresión

Como se indicó en el capítulo de Métodos, se ha dividido la muestra en un *grupo de cálculo* y un *grupo de validación*. El primero se ha utilizado para el estudio de regresión lineal múltiple que permita definir un modelo para la predicción del número de CD34+/33- recolectadas. El segundo comprende los últimos 32 trasplantes de la serie y se utiliza para validar el modelo estudiando la relación entre la cifra predicha por el modelo calculado en el otro grupo y la cifra real de células recolectadas.

La Tabla 16 muestra las variables analizadas, el resultado del análisis univariante de cada una frente a la variable dependiente (la cifra de células CD34+/33- por kg de peso recolectadas) y los coeficientes de las variables significativas en los modelos de regresión múltiple.

VARIABLES ESTUDIADAS	SIGNIFICACIÓN EN EL UNIVARIANTE	VARIABLES SIGNIFICATIVAS EN EL ANÁLISIS MULTIVARIANTE		
		P	B	IC 95%
Diagnóstico	+			
Edad	-			
Volemia	+	0,006	- 0,3	- 0,5 ; - 0,1
Grupo sanguíneo ABO	-			
Líneas de tratamiento previas	+			
Ciclos de tratamiento recibidos	+	< 0,0005	0,08	0,05 ; 1,1
Radioterapia previa	+			
Medula ósea previa	+	< 0,0005	- 1,2	- 1,6 ; - 0,8
Medula ósea pretrasplante	+	< 0,0005	1,1	0,6 ; 1,6
Enfermedad extramedular pretraspl.	-			
Remisión completa pretrasplante	+			
Número de aféresis	+			
Aféresis problemática	-			
Leucocitos basales	-			
Plaquetas basales	-			
CD34+/33- en SP basal	+			
% de CD34+/33- en SP basal	+			
Incremento de leuc. con la movilización	+			
Incremento de plq con la movilización	+			
Incremento de CD34+/33- en SP	+			
Incremento del % de CD34+/33-	+			
Leucocitos el 5º día de movilización	+			
Plaquetas el 5º día de movilización	+	0,002	0,004	0,002 ; 0,006
CD34+33- en SP el 5º día de mov. *	+	< 0,0005 (< 0,0005)	0,03 (0,055)	0,022 ; 0,038 (0,047 ; 0,063)
% de CD34+33- el 5º día de mov.	+	< 0,0005	15,9	12,2 ; 19,6
Cifra máxima de CD34+/33- en SP	+			
Día de máxima movilización	+			

Tabla 16 – Estudio de las variables capaces de predecir el número total de células CD34+/33- recolectadas. + : P < 0,05 - : P > 0,1 +/- : 0,05 ≤ P ≤ 0,1 B : coeficiente de regresión no estandarizado de cada variable incluida en el modelo final, con su intervalo de confianza del 95% * Entre paréntesis figuran los coeficientes del modelo que incluye únicamente como variable predictora la cifra de CD34+/33- en SP el 5º día de movilización.

Con el procedimiento de regresión lineal hacia delante el modelo con un mayor coeficiente de determinación corregido (R²c) alcanzaba un valor de 0,97, e incluía siete variables: la cifra absoluta de células CD34+/33- x 10⁶/l en SP el 5º día

de movilización, el porcentaje de células CD34+/33- en SP respecto al total de leucocitos ese mismo día, el número de ciclos recibidos, la infiltración medular en cualquier momento de la enfermedad, la infiltración medular patente en el momento del trasplante, la cifra de plaquetas el 5º día de movilización y la volemia del paciente.

Aunque la R²c del modelo mencionado es realmente alta –sólo el 3% de la variabilidad queda sin explicar- no es práctico utilizar una fórmula con siete variables para calcular un parámetro. Es posible construir un modelo de regresión que utiliza únicamente la cifra absoluta de células CD34+/33- en sangre periférica el 5º día de movilización y es capaz de predecir la cifra total de células CD34+/33- recolectadas con una R²c de 0,87. La fórmula generada por este modelo de regresión es la siguiente:

$$\text{CD34+/33-} \times 10^6/\text{kg recolectadas} = 0,35 + \left(0,055 \times \text{CD34+/33-} \times 10^6/\text{l en SP el 5º día de movilización} \right)$$

Esta fórmula permite estimar el producto recolectado de forma sencilla e intuitiva y con la solidez de un modelo capaz de explicar el 87% de la variabilidad. La Figura 21 muestra la relación entre el recuento de CD34+/33- en SP el 5º día y la cifra de CD34+/33- recolectadas.

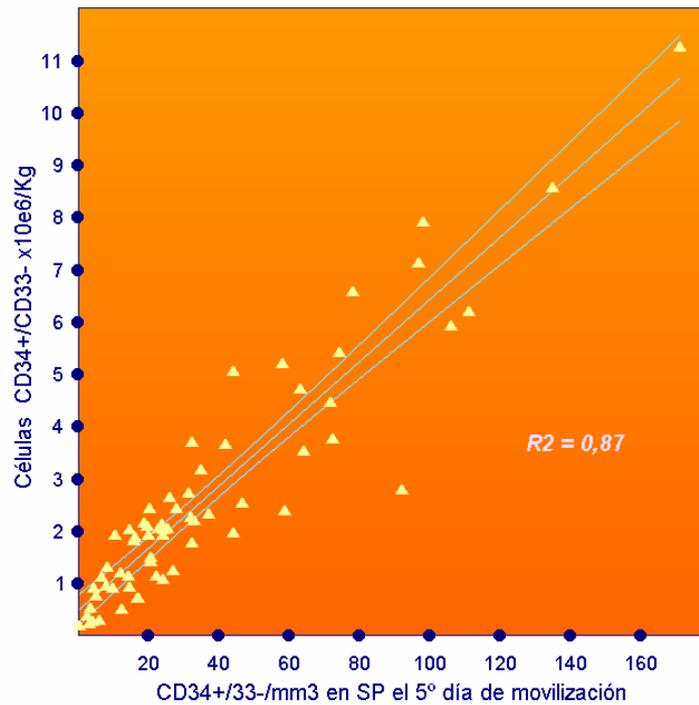


Figura 21 – Relación entre la cifra absoluta de células CD34+/33- en SP el 5º día de movilización y el número total de células CD34+/33- recolectadas. El diagrama corresponde al grupo de cálculo del modelo de regresión.

6.2 – Validación del modelo

Se ha utilizado el modelo formulado en el apartado anterior para obtener una cifra "calculada" de células CD34+/33-. El grupo de validación ha sido dividido en cuatro subconjuntos según el valor real de células CD34+/33- recolectadas. En la Figura 22 se comparan, en cada uno de estos cuatro subconjuntos las cifras real y

“calculada” de células CD34+/33-. La aproximación entre ambos valores es especialmente patente en el subgrupo con menor número de células.

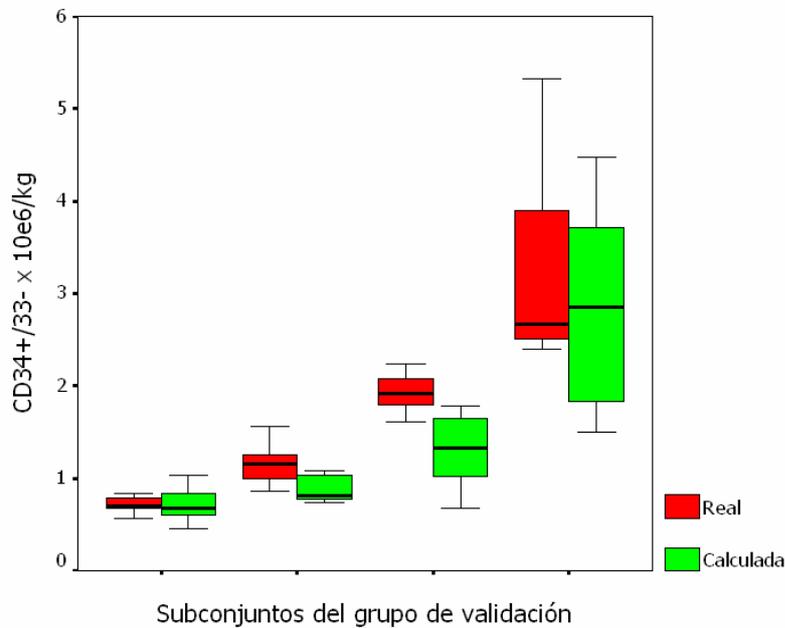


Figura 22 – Comparación entre las cifras reales de células CD34+/33- recolectadas y las cifras calculadas según el modelo de regresión en los cuatro subconjuntos del grupo de validación. La altura de la caja representa el rango intercuartílico, la línea que la cruza, la mediana y los “bigotes”, los valores extremos excluyendo los *outliers*.

6.3 – Factores ajenos al resultado de la movilización

La potencia predictora mostrada por las variables que expresan el resultado de la movilización podría ocultar o distorsionar la posible influencia de otras variables previas. Por ello hemos construido un modelo de regresión múltiple a

partir únicamente de las variables disponibles antes de comenzar la movilización. No se incluyeron, por tanto los recuentos en sangre periférica de células CD34+/33-, leucocitos ni plaquetas postmovilización ni el porcentaje de CD34+/33- en este momento.

El resultado fue un modelo con una R^2c de 0,38 del cual formaban parte tres variables: el recuento de células CD34+/33- en SP premovilización ($P < 0,0005$; $B = 0,94$; IC 95%: 0,56; 1,3), el número de ciclos de quimioterapia recibidos con anterioridad ($P = 0,008$; $B = -0,15$; IC 95%: -0,26; -0,04) y el diagnóstico de linfoma ($P = 0,034$; $B = -1,23$; IC 95%: -2,4; -0,1).

7 – FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA MOVILIZACIÓN

Se ha comprobado en los apartados anteriores que el factor más determinante para recolectar un número suficiente de células CD34+/33- es la obtención de una movilización suficiente. El indicador más adecuado de esta movilización es la cifra absoluta de células CD34+/33- en SP tras la movilización. Esta última parte de los resultados pretende analizar qué factores influyen de forma independiente sobre la cifra absoluta de células CD34+/33- que se va a conseguir tras cinco días de movilización con G-CSF.

VARIABLES ESTUDIADAS	SIGNIFICACIÓN EN EL UNIVARIANTE	VARIABLES SIGNIFICATIVAS EN EL ANÁLISIS MULTIVARIANTE		
		P	B	IC 95%
Diagnóstico *	+	0,016	17,6	3,4 ; 31,8
Edad	+			
Volemia	-			
Grupo sanguíneo ABO	-			
Líneas de tratamiento previas	+			
Ciclos de tratamiento recibidos	+	0,03	- 1,5	- 3 ; - 0,1
Radioterapia previa	+/-			
Medula ósea previa	+			
Medula ósea pretrasplante	+			
Enfermedad extramedular pretraspl.	-			
Remisión completa pretrasplante	-			
Leucocitos basales	-			
Plaquetas basales	+			
CD34+ /33- en SP basal	+	< 0,0005	16,9	10 ; 23,7
% de CD34+/33- en SP basal	+			
Incremento de leuc. con la movilización	+			
Incremento de plq con la movilización	+			

Tabla 17 – Análisis de los factores que influyen sobre el número absoluto de células CD34+/33- que es posible alcanzar en SP tras cinco días de movilización con G-CSF + : P < 0,05 - : P > 0,1 +/- : 0,05 ≤ P ≤ 0,1 B : coeficiente de regresión no estandarizado de cada variable incluida en el modelo final, con su intervalo de confianza del 95% * El contraste significativo fue el de cáncer de mama frente a los demás. Su codificación fue 0=otros ; 1=CM, por lo que el coeficiente indica mayor movilización en las pacientes con cáncer de mama.

En la Tabla 17 se resume el estudio de los factores que influyen sobre la movilización. El coeficiente de determinación corregido (R^2c) del modelo fue de 0,4. Aunque resulta altamente significativo, no tiene suficiente precisión para tratar de predecir de antemano la cifra que se va a conseguir con la movilización. Sin embargo, sí que es válido para dilucidar los parámetros que influyen de forma independiente en el resultado de la movilización. Tres variables resultan significativas en el modelo de regresión lineal múltiple: el recuento de células CD34+/33- en SP antes de la movilización, el diagnóstico de cáncer de mama y el número total de ciclos recibidos antes del trasplante.

DISCUSIÓN

1 – CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA SERIE

El trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica constituye hoy en día un procedimiento terapéutico ampliamente utilizado, con ciertas indicaciones sólidamente establecidas y muchas otras donde su uso está siendo evaluando de forma experimental. La constatación preliminar del beneficio clínico que podía aportar al paciente y de sus potenciales ventajas sobre otras técnicas de trasplante hematopoyético llevó a la generalización de su uso al principio de la década de los 90. Se puede afirmar que la inclusión de este procedimiento en el arsenal terapéutico diario ha precedido al conocimiento en profundidad de ciertos aspectos biológicos, metodológicos y clínicos relevantes para garantizar el resultado del trasplante. El estudio pormenorizado de las series de trasplante nos permite ahora clarificar la relación entre las numerosas variables que intervienen y sacar conclusiones que permitan mejorar los resultados.

La presente serie incluye todos los TPH de SP llevados a cabo en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid durante los primeros cuatro años desde la puesta en marcha del programa. Se han tenido en cuenta tanto los pacientes trasplantados en la Unidad Clínica de Hematología como en la de Oncología Médica. Todo ello contribuye a minimizar el riesgo de un sesgo de selección. En contrapartida, la serie contiene varias fuentes de heterogeneidad en aspectos como el tipo de neoplasia, el acondicionamiento utilizado, la extensión de la enfermedad o el volumen de tratamiento acumulado. Ello no es extraño dado su carácter de estudio observacional, aunque prospectivo, en el que las características del tratamiento administrado no se han modificado en función de los objetivos científicos del estudio. Sin embargo, el tamaño de la muestra, en la línea de los estudios más amplios publicados sobre este tema¹⁷⁰⁻¹⁷⁸, permite afrontar este problema mediante técnicas multivariantes, estudiando además un número considerable de parámetros, mayor que el de cualquiera de las series publicadas.

Nuestra serie presenta, por otra parte, una considerable homogeneidad en otros aspectos relevantes como el procedimiento de movilización, de la que adolecen casi todos los estudios publicados hasta la fecha. Todos los estudios multivariantes sobre factores que influyen en el injerto hematopoyético contienen pacientes movilizados con quimioterapia, sola o asociada a factores de crecimiento. Algunos incluyen también grupos de pacientes movilizados exclusivamente con G-CSF^{170, 174-177, 179}, el más numeroso de los cuales incluye 119 pacientes de la serie de Bensinger *et ál.*¹⁷⁰. Nuestro estudio analiza 211 trasplantes con un régimen de movilización único a base de G-CSF.

2 – RESULTADO GLOBAL DE LA MOVILIZACIÓN

El régimen de movilización a base de 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ al día a partir de una situación hemoperiférica basal ha mostrado en nuestra experiencia varias ventajas reseñables. En primer lugar, el momento idóneo para la extracción celular es altamente predecible –el 98% de los pacientes presentaron el pico de células CD34+/33- en sangre periférica el quinto o el sexto día de movilización- lo que permite planificar satisfactoriamente la recolección celular. Otros autores encuentran resultados similares en este sentido^{33, 110}. Las leucoaféresis seguidas de criopreservación programada de los productos son procedimientos que suman entre cinco y ocho horas, y por tanto resulta beneficioso poder iniciar el procedimiento sin tener que esperar a los resultados de la citometría de flujo. Por otra parte, el procedimiento de movilización no produjo efectos adversos graves, multiplicó la cifra de células CD34+/33- en SP una mediana de 25 veces y permitió la recolección de productos suficientes para el trasplante en 2 ò 3 aféresis de volumen convencional en la mayoría de los pacientes.

Sin embargo, es interesante reseñar el descenso observado en la cifra de plaquetas durante el tratamiento de movilización con G-CSF. Aunque no produjo ningún efecto clínico relevante ni alcanzó cifras de riesgo, el 83% de los pacientes experimentó una disminución franca del recuento plaquetar. Este fenómeno puede ser de la misma naturaleza que el señalado por Bensinger *et ál.*^{170, 180} cuando encuentran en su serie una relación entre el tratamiento con factores de crecimiento postrasplante (G-CSF ó GM-CSF) y cierto retraso en el injerto plaquetar. Este efecto resulta significativo tras su estudio multivariante, con un “riesgo relativo” de recuperación plaquetar en un momento dado de 0,59 (IC 95%: 0,43-0,82), lo que lleva a estos autores a cuestionar incluso las recomendaciones de la *American Society of Clinical Oncology* sobre la utilización de factores de crecimiento hematopoyético en Oncología¹⁶³. El origen de este fenómeno no está aclarado; Bensinger *et ál.* sugieren dos posibles explicaciones hipotéticas: el posible efecto de estas citoquinas para inducir la diferenciación hacia granulocitos de progenitores

intermedios, evitando su evolución hacia megacariocitos, y el posible consumo de plaquetas por las células mieloides activadas. En nuestra serie, la administración de factores de crecimiento postrasplante no se asoció a retraso del injerto plaquetar ni a aumentos en el consumo de plaquetas al analizar específicamente los grupos diagnósticos en que hubo una distribución aleatorizada.

3 – FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA PRECOCIDAD DEL INJERTO

Todos los pacientes de nuestra serie, excepto los cuatro que fallecieron en los primeros días por complicaciones, alcanzan el injerto granulocítico (más de $0,5 \times 10^9/l$) antes del final de la cuarta semana postrasplante. Las diferencias entre pacientes son notables, entre 8 y 26 días, pero todos han injertado antes de un mes. Ello no es así en el caso del injerto plaquetar, donde una pequeña proporción de pacientes experimenta un retraso notable. Nuestro estudio analiza la influencia de 37 parámetros distintos sobre los tiempos de injerto, a pesar de lo cual todavía quedan fuera del estudio hipotéticas fuentes de variabilidad. Tal vez la más importante sea la que se refiere al consumo periférico *in vivo* de plaquetas y neutrófilos en presencia de ciertas complicaciones en el postrasplante: hemorragias, infecciones, toxicidad hepática severa, etc. Nosotros hemos tenido la oportunidad de comprobar puntualmente como este factor proporciona una explicación evidente para retrasos del injerto plaquetar en pacientes donde el resto de los factores estudiados son favorables. Como se puede apreciar en las Tablas 18 y 19, los estudios multivariantes publicados acerca de los factores que influyen sobre el injerto analizan entre 7 y 15 variables^{108, 170-182}. Ninguno de ellos estudia en profundidad la influencia del consumo periférico postrasplante.

Nuestro estudio, como la mayor parte de los publicados, contiene pacientes con una variedad de tumores que difieren notablemente en cuanto a la biología de sus células, su patrón de diseminación, su afinidad por los territorios medulares y por la sangre periférica, la edad de aparición etc. Junto a ello, numerosos matices de su tratamiento previo al trasplante presentan diferencias notables que podrían escapar a las posibilidades de este estudio multivariante: distinta mielotoxicidad de los fármacos utilizados, intensidad de dosis, extensión de los campos de irradiación utilizados, dosis de radioterapia, etc. Por todo ello, hemos considerado oportuno en nuestro estudio considerar de forma especial a esta variable y repetir el análisis utilizando los grupos diagnósticos como factores de estratificación. Como iremos

comentando a continuación, ello nos ha permitido apreciar la presencia sistemática de las variables más consistentes –los estimadores de calidad del producto celular trasplantado- y aclarar la influencia de algunos factores no valorables en ciertos grupos diagnósticos, como el régimen de acondicionamiento o la utilización de factores de crecimiento postrasplante.

Es posible distinguir, a efectos meramente organizativos, tres grupos de variables entre las muchas analizadas en el presente estudio y en los publicados en la literatura. Un primer grupo comprendería todas las características previas al trasplante del paciente, el tipo de tumor, los tratamientos recibidos, la extensión de su enfermedad y los parámetros analíticos pretrasplante. Un segundo grupo se refiere a los aspectos relacionados con la forma de realizar el tratamiento de altas dosis de quimioterapia: régimen de acondicionamiento y utilización de factores de crecimiento postrasplante. El tercer grupo serían las variables que estiman la calidad del producto celular que se trasplanta. Las Tablas 18 y 19 resumen los resultados de los estudios multivariantes más extensos publicados hasta la fecha acerca de los factores que determinan el injerto hematopoyético en el TPH de SP. La Tabla 18 agrupa los trabajos que, como este, incluyen el estudio de la subpoblación CD34+/33- y la 19 los que no lo hacen.

Autor	Referencia	Nº trasplantes	Diagnóstico	Movilización	Variables analizadas	Factores significativos sobre el injerto granulocítico	Factores significativos sobre el injerto plaquetar
Pecora <i>et ál.</i> Hackensack	174	410	Varios	QT + CSF / CSF	9	CD34+ CD34+/33- Diagnóstico: mama (+) Diagnóstico: linfoma (-)	CD34+ CD34+/33- Diagnóstico: mama (+)
Stewart <i>et ál.</i> Calgary	177	178	Varios	QT + CSF / CSF	15	CD34+ CSF postrasplante Acondicionamiento	CD34+ CD34+/33- Acondicionamiento Selección positiva (-)
Sampol <i>et ál.</i> P. Mallorca	175	67	Varios	QT + CSF / CSF	13	CD34+/33- CSF postrasplante*	CD34+
Derksen <i>et ál.</i> Ámsterdam	108	59	Varios (no MM)	QT + CSF	14	CD34+/33-	CD34+/41+
Pérez Calvo Madrid		211	Varios	CSF	37	CD34+/33- CFU-GM Enf. Extramedular pretrasplante Diagnóstico: mama (+) Acondicionamiento** CSF postrasplante***	CD34+/33- Remisión completa pretrasplante Nº líneas de tto. previo CFU-GM** Edad****

Tabla 18 – Estudios multivariantes de factores que influyen sobre el injerto en TPH de SP que analizan la subpoblación CD34+/33-. * Sólo es significativa en el grupo con menos PH ** Sólo en el grupo con cáncer de mama *** Sólo en los grupos de linfoma y mieloma **** Sólo en el grupo de mieloma QT: Quimioterapia; CSF: factor de crecimiento hematopoyético (G-CSF ó GM-CSF); MM: mieloma múltiple

Autor	Referencia	Nº trasplantes	Diagnóstico	Movilización	Variables analizadas	Factores significativos sobre el injerto granulocítico	Factores significativos sobre el injerto plaquetar
Weaver <i>et ál.</i> Memphis	172	692	Varios	QT / QT + CSF	8	CSF postrasplante CD34+	CSF postrasplante Acondicionamiento: STAMP-V (-) Necesidad de 2 movilizaciones (-)
Bensinger <i>et ál.</i> Seattle	170	243	Varios	QT + CSF / CSF	12	CD34 > 2,5 x 10 ⁶ /kg CSF postrasplante (+) Acondicionamiento: ICT	CD34 > 2,5 x 10 ⁶ /kg CSF postrasplante (-) Radioterapia previa CD34 > 5 x 10 ⁶ /kg
Lowenthal <i>et ál.</i> Burdeos	173	243	Leucemia, linfoma, MM	QT / QT + CSF	12	CFU-GM* CSF en mov. y postrasplante	CFU-GM* Acondicionamiento: busulfán Acondicionamiento: ICT
Tricot <i>et ál.</i> Little Rock	171	225	MM	QT + CSF	12	CD34+ > 2 x 10 ⁶ /kg < de 1 año de QT previa**	CD34+ > 2 x 10 ⁶ /kg Rápida recuperación plq. en QT mov. < de 1 año de QT previa**
Ketterer <i>et ál.</i> Lyon	178	168	Linfoma, MM	QT + CSF	9	CD34+	CD34+
Nademanee <i>et ál.</i> , City of Hope	179	95	Linfoma	NO / CSF	10	CD34+ Mov. con CSF	CD34+ Nº de aféresis
To <i>et ál.</i> Adelaida	181	38	Varios	QT	8	CFU-GM*	CFU-GM*

Tabla 19 – Estudios multivariantes de factores que influyen sobre el injerto hematopoyético que no incluyen el análisis de la subpoblación CD34+/33-. * Estos estudios no analizan la dosis de células CD34+ infundidas ** Sólo significativa en el grupo de primeros trasplantes. ICT: irradiación corporal total; QT: Quimioterapia; CSF: factor de crecimiento hematopoyético (G-CSF ó GM-CSF); MM: mieloma múltiple; mov.: movilización

3.1 – Factores previos al trasplante

El diagnóstico de cáncer de mama se asocia en nuestro estudio con una probabilidad más alta de recuperación granulocítica precoz. En el caso de la recuperación plaquetar, las pacientes con cáncer de mama presentan asimismo un tiempo de injerto significativamente menor que el resto (mediana de 11 *versus* de 13 días), aunque no es una de las variables significativas en el análisis multivariante. Pecora *et ál.*¹⁷⁴ describen asimismo la influencia significativa del diagnóstico del paciente sobre la recuperación tanto granulocítica como plaquetar. En este estudio, las pacientes con cáncer de mama, especialmente aquellas en estadio II y III, presentan una ventaja significativa tanto en los días para alcanzar $0,5 \times 10^9/l$ granulocitos como $1 \times 10^9/l$ granulocitos ó $20 \times 10^9/l$ plaquetas. El análisis inicial de 54 pacientes de la serie del Fred Hutchinson Cancer & Research Center de Seattle¹⁸⁰ también encuentra una asociación independiente entre el diagnóstico de cáncer de mama y una recuperación plaquetar más precoz, aunque en el análisis de la serie ampliada hasta 243 trasplantes¹⁷⁰ ya no se observa este efecto en el estudio multivariante.

La edad del paciente presenta en nuestro estudio una influencia significativa sobre la recuperación plaquetar únicamente en los pacientes con mieloma. La simple observación de la Figura 12 muestra cómo todos los pacientes con mieloma por encima de 59 años tienen un injerto plaquetar relativamente tardío. El estudio de la amplia serie de trasplante en mieloma presentado por Tricot *et ál.*¹⁷¹ muestra una diferencia significativa en el tiempo de injerto plaquetar (hasta $50 \times 10^9/l$) del primer trasplante en el análisis univariante a favor de los pacientes menores de 50 años, aunque no mantiene su significación frente a otras variables en el multivariante. Un análisis posterior de la misma serie¹⁸³ la separa en tres grupos utilizando dos puntos de corte en 50 y 60 años. Esta estrategia demuestra tan sólo pequeñas diferencias en el tiempo de injerto plaquetar (12 vs. 13 vs. 14 días), que se encuentran en el límite de la significación estadística ($P = 0.06$).

En el grupo global, sin embargo, la edad no influye de forma significativa en la recuperación granulocítica y plaquetar ni siquiera en el análisis univariante. Tampoco lo hace en el análisis estratificado en los grupos de mama y linfoma ni en la recuperación granulocítica de los mielomas, lo que permite descartar que se trate de un factor de confusión. Otras series amplias que analizan igualmente esta variable tampoco encuentran una relación significativa con el injerto hematopoyético^{172, 174}.

En nuestra serie la persistencia de enfermedad extramedular en el momento del trasplante se asocia con una recuperación granulocítica más lenta en la serie global y con un mayor consumo de concentrado de hematíes en los pacientes con linfoma. Por su parte, la situación de remisión completa en el momento del trasplante está en relación con un injerto plaquetario más precoz y con un menor consumo de transfusiones de plaquetas. La influencia pronóstica de estas variables sobre la supervivencia global o libre de enfermedad postrasplante ha sido demostrada en distintos tumores, lo que ha contribuido a matizar las indicaciones del trasplante en los últimos años. El análisis de nuestra serie, que comprende como hemos señalado los primeros trasplantes realizados en un momento muy precoz de la evolución de esta técnica muestra la influencia de estas variables en el injerto, por delante incluso de las que miden específicamente la presencia de enfermedad en la médula ósea. A la vista de estos resultados cabe plantearse en qué medida el retraso en el injerto hematopoyético puede contribuir al significado pronóstico de estas variables.

El volumen de tratamiento recibido con anterioridad al trasplante, expresado como número de líneas, es un factor con influencia independiente sobre la recuperación de plaquetas en nuestra serie. Asimismo, el número de ciclos de quimioterapia recibidos condiciona de forma independiente el consumo de concentrados de hematíes durante el trasplante. Investigadores de la Universidad de Salamanca han demostrado mediante cultivos a largo plazo cómo la médula ósea en el momento del trasplante ya se encuentra dañada¹⁸⁴. Analizando aspirados medulares previos al acondicionamiento estos autores encuentran un déficit funcional que afecta a los progenitores comprometidos y al estroma medular, y cuya

magnitud se asocia negativamente con el tiempo de injerto plaquetar después del trasplante. Los tratamientos quimioterápicos recibidos antes del trasplante desempeñan un papel fundamental en el daño medular. Neben *et ál.*¹⁸⁵ demostró en un modelo de trasplante singénico murino como la exposición de los animales donantes a diferentes quimioterápicos tenía un efecto negativo sobre distintos estimadores de la función medular después del trasplante. Este efecto resultó más marcado tras el tratamiento con Busulfán, un fármaco cuya toxicidad sobre los progenitores primitivos es bien conocida.

En el terreno clínico, diversos estudios han encontrado en humanos resultados similares a los nuestros. Drake *et ál.*¹⁸⁶ desarrollaron una escala que jerarquiza la toxicidad medular de los distintos quimioterápicos. Gandhi *et ál.*¹⁸⁷ utilizan esta escala en una serie de 57 pacientes y muestran como la exposición a fármacos del máximo nivel de toxicidad en la Escala de Drake, grupo que incluye las nitrosoureas y el melfalán (la Escala de Dreger no tiene en cuenta el Busulfán), se asocia con una recuperación plaquetar más retrasada. Sus hallazgos les llevan a proponer umbrales de células CD34+ diferentes según el volumen de quimio y radioterapia recibidos con anterioridad. La serie de Tricot *et ál.*¹⁷¹ en mieloma múltiple muestra como la exposición previa a fármacos citotóxicos durante un tiempo superior a un año se asocia de forma independiente con un injerto granulocítico y plaquetar más tardío. Watts *et ál.*¹⁸², en una serie de 101 linfomas encuentran relación entre el tratamiento previo con quimioterapia tipo mini-BEAM y el retraso en el injerto hematopoyético. Este régimen incluye fármacos profundamente citotóxicos como el BCNU y el melfalán. Dreger *et ál.*¹⁸⁸ encuentran un efecto similar sobre el injerto de plaquetas entre pacientes que reciben más de un ciclo de dexametasona-BEAM, un régimen similar al mencionado en lo referente a su mielotoxicidad.

La cifra de plaquetas el 5º día de movilización presenta una relación inversa significativa en el análisis multivariante con el número de transfusiones de plaquetas necesarias durante el trasplante. Un factor que puede contribuir a este efecto es la recolección de abundantes plaquetas en la leucoaféresis. En nuestra experiencia la recolección es tanto más abundante cuanto mayor es el recuento plaquetario el día

de la aféresis (datos no presentados). El proceso de criopreservación programada con 10% de DMSO, plasma y medio 199 es similar al utilizado en la criopreservación de plaquetas para transfusión. En el momento de la infusión, buena parte de estas plaquetas son viables, y pueden retrasar en unos días la necesidad de transfusiones. Por otra parte, la relación directa, igualmente significativa en el multivariante, del recuento de plaquetas el 5º día de movilización y el número de células CD34+/33-recolectadas proporciona otra explicación para el fenómeno anterior. Bajo nuestro punto de vista, ambas explicaciones son perfectamente compatibles entre sí.

3.2 – Acondicionamiento y CSF postrasplante

El régimen de acondicionamiento utilizado para el trasplante mostró influencia independiente sobre el injerto granulocítico en el análisis de las pacientes con cáncer de mama. En este grupo el análisis se realizó enfrentando el régimen STAMP-V frente a cualquier nivel de escalada de dosis según el esquema especificado en la sección de Métodos. La escalada de dosis se asoció con una recuperación granulocítica más lenta. El diseño de este estudio no es adecuado para valorar la influencia del acondicionamiento en el resto de la serie, puesto que el régimen utilizado está ligado a los grupos diagnósticos. Stewart *et ál.*¹⁷⁷, en una serie de 178 pacientes renunciaron al estudio de los grupos diagnósticos para poder incluir el régimen de acondicionamiento en su análisis multivariante. El resultado mostró la asociación independiente del régimen a base de 200 mg/m² de melfalán con un injerto granulocítico y plaquetar más tardío. Weaver *et ál.*¹⁷² encuentran en su serie una recuperación plaquetar más precoz asociada al régimen STAMP-V. Las series de Bensinger *et ál.*¹⁷⁰ y Lowenthal *et ál.*¹⁷³ muestran una asociación negativa entre la precocidad del injerto granulocítico y plaquetar respectivamente y la utilización de regímenes de acondicionamiento que incluyan irradiación corporal total. El estudio de Lowenthal *et ál.* demuestra asimismo un mayor tiempo de recuperación plaquetar con regímenes a base de Busulfán.

La utilización postrasplante de factores de crecimiento mostró una influencia cercana a la significación sobre la recuperación granulocítica en el análisis multivariante del grupo global. Como ya comentamos anteriormente, en el grupo de pacientes con cáncer de mama (más de la mitad de los trasplantes de la serie) se administró G-CSF en todos los casos. Ello hace que naturalmente este parámetro no pueda ser evaluado en ese subgrupo, y compromete la potencia del análisis para detectar diferencias en la serie global, a pesar de lo cual fue la variable con una P más baja de las no incluidas en el modelo. En los grupos de linfomas y mielomas, en los que sí que resulta posible evaluar su influencia, fue una de las dos variables asociadas independientemente con la probabilidad de un injerto granulocítico precoz. Varios de los estudios multivariantes publicados coinciden en encontrar esta asociación independiente entre el uso de factores de crecimiento postrasplante y el injerto granulocítico^{170, 172-173, 175, 177, 182}.

3.3 – Estimadores del número de PH trasplantados

3.3.1 – Recuentos celulares

De entre las distintas posibilidades analíticas para estimar la cantidad de PH presentes en el producto celular trasplantado, sin duda la determinación más rápida y sencilla es el recuento de células totales. Sin embargo, este parámetro no presenta una correlación significativa con el injerto granulocítico en el estudio univariante (Fig. 13-A). La correlación con tiempo de injerto plaquetar, siendo estadísticamente significativa, es pobre ($R_s = 0,14$) y no muestra influencia independiente tras el análisis multivariante. Ninguno de los análisis multivariantes publicados revela la utilidad de este parámetro para predecir los tiempos de injerto^{108, 170-182}.

Un parámetro prácticamente igual de inmediato y sencillo es el recuento de CMN en el producto celular. En este estudio hemos analizado comparativamente dos formas distintas de realizar el recuento diferencial de CMN: de forma automática con el contador Technicon H1 (sumando las poblaciones clasificadas como "monocitos", "linfocitos" y "LUC") y de forma manual al microscopio. Probablemente la diferencia fundamental entre ambas técnicas sea la inclusión en el recuento manual de formas granulocíticas inmaduras que quedan excluidas en el recuento automático por la presencia de gránulos de peroxidasa. Por ello, la cifra de CMN microscópicas es en general algo mayor y correlaciona mejor con la cifra de células totales (Figuras 13-A y 13-B). La correlación entre ambos recuentos de CMN revela un grado de dispersión suficiente para considerarlos como parámetros diferentes (Figura 13-E). Ninguna de las dos variables correlacionó significativamente con el injerto granulocítico en el grupo global. En los pacientes con linfoma, sin embargo, las CMN microscópicas fueron uno de los parámetros significativos tras el análisis multivariante. La correlación con el injerto plaquetar se encuentra en los límites de la significación, pero es nuevamente pobre. A pesar de ello, el recuento de CMN microscópico fue la variable con una P más baja de las excluidas del modelo multivariante. La conclusión que se puede extraer acerca de cual de las dos técnicas de recuento de CMN es más adecuada es una discreta ventaja a favor del recuento manual. Mientras el recuento automático no parece aportar ninguna ventaja sustancial en lo referente a la predicción del injerto en presencia de otros factores, el recuento manual de CMN tiene una influencia discreta sobre la recuperación granulocítica. De cualquier manera, el recuento de CMN es tan sólo un estimador grosero de la calidad del producto celular. Una vez más, ninguno de los estudios multivariantes de la literatura revela su influencia independiente sobre los tiempos de injerto cuando se tienen en cuenta otros estimadores^{108, 170-182}.

3.3.2 – CFU-GM

El recuento de CFU-GM muestra una correlación altamente significativa con los tiempos de injerto granulocítico y plaquetar. La Figura 16 permite apreciar ciertos umbrales por encima de los cuales el injerto es universalmente precoz. Todos los pacientes que reciben más de $6 \times 10^4/\text{kg}$ CFU-GM alcanzan $0,5 \times 10^9/\text{l}$ granulocitos antes del día +15. Todos (excepto uno) los que reciben más de $8 \times 10^4/\text{kg}$ alcanzan el injerto plaquetar estable en este mismo plazo. Este parámetro mantiene su influencia sobre el injerto granulocítico tras el análisis multivariante del grupo global y sobre el injerto plaquetar en el grupo con cáncer de mama. En dos estudios multivariantes publicados que no incluyen la determinación de células CD34+ ni sus subpoblaciones, el recuento de CFU-GM mostró influencia independiente sobre los injertos granulocítico y plaquetar^{173, 181}. Por otra parte, Amigo *et ál.*¹⁸⁹ demostraron como el número de CFU-GM trasplantados y la dosis de células CD34+ son los factores más relevantes para el mantenimiento de una hematopoyesis adecuada a largo plazo tras el trasplante. Hay que hacer notar cómo, a pesar de tratarse de una técnica que detecta los progenitores granulocíticos y monocíticos, presenta una notable relación con el injerto plaquetar, incluso en los análisis multivariantes. Estos resultados afirman su carácter de estimador indirecto del número de PH pluripotenciales o con diferenciación megacariocítica.

Los puntos débiles del recuento de CFU-GM son básicamente dos. El primero, que limita definitivamente su utilidad para guiar la recolección de PH, es la necesidad de esperar dos semanas para obtener los resultados. El segundo es su imprecisión y alta variabilidad, como han demostrado estudios de intercomparación entre distintos laboratorios^{113, 120}. Esta falta de reproducibilidad compromete las posibilidades de extrapolar los datos de los estudios a otras instituciones. Sin embargo, una correcta validación de la técnica llevada a cabo en un laboratorio concreto que incluya un estudio de correlación positivo con los tiempos de injerto la hace perfectamente válida para cooperar con otras variables más precoces en la estimación de la calidad del injerto.

3.3.3 – Células CD34+ y CD34+/33-

La cuantificación de las células CD34+ por citometría de flujo es una técnica cuyos resultados pueden estar disponibles en una o dos horas. Su imprecisión y variabilidad, aun no siendo despreciables, no alcanzan los límites de las CFU-GM y han sido mejorados notablemente en los últimos años^{113-114, 117-118, 190}. El análisis de toda la población CD34+ es hoy en día el parámetro más utilizado en la clínica para estimar la calidad del injerto y guiar la recolección. Numerosos estudios demuestran la influencia independiente de este parámetro sobre los tiempos de injerto granulocítico y plaquetar^{170-172, 174-175, 177-179}.

El estudio de la subpoblación CD34+/33- permite detectar una población celular más restringida y, de alguna manera, "estrechar el cerco" en torno a los PH no comprometidos. La subpoblación CD34+/33- de pequeño tamaño y bajo SS parece contener las células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTCIC), responsables de la autorrenovación y estabilidad definitiva de un injerto hematopoyético¹⁰³⁻¹⁰⁵. La correlación entre las células CD34+ totales y la subpoblación CD34+/33- no es perfecta^{109, 174, 191}. Diversos autores han encontrado una proporción de células CD33- variable en función de características como el régimen de movilización utilizado o la extensión de la quimioterapia previa recibida^{107, 109, 111, 174}. Según las observaciones de algunos trabajos, los productos recolectados en ciertos pacientes pueden contener un número aparentemente adecuado de células CD34+, pero con una proporción insuficiente de células CD34+/33-^{108, 174, 190}. En estos casos, el número absoluto de células CD34+/33- constituiría un estimador más preciso de la calidad del injerto.

El número de células CD34+/33- trasplantadas ha resultado ser sin ninguna duda el factor con una influencia más consistente sobre la dinámica de injerto en nuestro estudio. Es la variable más significativa en el estudio multivariante de factores con influencia sobre el injerto granulocítico, tanto en el grupo global como en el análisis de los estratos con cáncer de mama y con mieloma. Lo mismo sucede en el estudio de factores que determinan el injerto plaquetar, en el grupo global y en los grupos de cáncer de mama, linfoma y mieloma. Cada aumento de un millón

de células CD34+/33- por kg de peso en el producto infundido (manteniendo constantes las demás variables predictoras) incrementa la probabilidad de injerto granulocítico en un momento determinado entre un 14% y un 44%, y la de injerto plaquetar entre un 27% y un 57%. La Figura 15 permite apreciar como, aun no explicando toda su variabilidad, la dosis de células CD34+/33- infundidas permite estimar los tiempos de injerto con más que razonable seguridad.

Se han publicado cuatro series de trasplante que, como nosotros, analizan mediante técnicas multivariantes los factores que influyen sobre el injerto incluyendo la dosis de células CD34+/33-^{108, 173, 175, 177} (Tabla 18). En la más extensa de ellas, Pecora *et ál.*¹⁷⁴ estudian 357 pacientes de una serie total de 410. Tras introducir 9 variables en su modelo el resultado coincide en los factores con influencia independiente sobre el injerto granulocítico y plaquetar. En ambos casos, la dosis de células CD34+ totales y la subpoblación CD34+/33- (ya sea como porcentaje o como valor absoluto) comparten un resultado significativo con el diagnóstico del paciente. Este resultado demuestra como el recuento de células CD34+/33- aporta información propia, explicando por sí sola parte de la variabilidad de los tiempos de injerto que no es explicada por el recuento de CD34+ totales. Por añadidura, en este estudio la dosis de células CD34+/33- fue el único factor con influencia independiente sobre el número de transfusiones de hematíes y plaquetas.

Stewart *et ál.*¹⁷⁷ encuentran asimismo una influencia independiente simultánea de la dosis total de células CD34+ y del porcentaje de CD34+/33- sobre el tiempo de recuperación de plaquetas. Estos autores distinguen dos grupos de dosis de CD34 totales estableciendo un punto de corte en $5 \times 10^6/\text{kg}$. Dentro de cada uno de estos grupos, los pacientes con una proporción mayor del 30% de células CD34+/33- presentaron un injerto plaquetar más precoz. En los estudios de Sampol *et ál.*¹⁷⁵ y Derksen *et ál.*¹⁰⁸, la dosis de células CD34+/33- infundidas fue la única variable con influencia significativa sobre el tiempo de injerto granulocítico en el análisis multivariante. En ambos casos la población total de células CD34+ fue analizada en el mismo modelo multivariante y no mostró influencia independiente frente a la dosis de CD34+/33-. En el estudio de Derksen *et ál.*¹⁰⁸ las células CD34+/33- presentaron una mejor correlación con el injerto plaquetar que las

CD34+ totales, aunque ninguna de las dos mantuvo su influencia tras el análisis multivariante frente a la subpoblación CD34+/41+, expresiva de los progenitores comprometidos hacia la serie megacariocítica.

La relación entre la dosis de células CD34+/33- infundidas y los tiempos de injerto no es lineal, como se puede apreciar en la Figura 15. El beneficio aportado por el aumento de la dosis celular es muy patente con dosis bajas, pero cabe plantearse si se mantiene en la zona del diagrama de dispersión que corresponde a las dosis más altas de células CD34+/33-. Con objeto de intentar extraer recomendaciones prácticas sobre los límites razonables que es preciso recolectar se realizó la comparación entre los grupos trasplantados con menos de $1 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+/33-, entre 1 y $2,5 \times 10^6/\text{kg}$ y con una cifra superior a $2,5$. En nuestra serie, el beneficio de administrar las cifras más altas respecto del grupo de dosis intermedia resulta altamente significativo desde el punto de vista estadístico, tanto para el tiempo de injerto granulocítico como plaquetar. Es razonable, sin embargo, valorar adecuadamente la posible relevancia clínica de esta diferencia. La tabla actuarial nos indica que en el grupo trasplantado con una dosis intermedia un paciente tiene una probabilidad de 0,97 de alcanzar el injerto granulocítico en dos semanas y de 0,93 de alcanzar el injerto plaquetar en tres. Las medianas de recuperación granulocítica y plaquetar en este grupo son de 10 y 12 días respectivamente, frente a 9 y 10 en el grupo trasplantado con la dosis mayor. Aunque la diferencia es estadísticamente incuestionable, el clínico debe valorar su importancia global teniendo en cuenta la dificultad y el coste que puede suponer recolectar determinadas dosis de células a pacientes concretos.

Varios estudios sugieren superar diferentes umbrales de células CD34+/33- para obtener un injerto hematopoyético más precoz. Los trabajos de Sampol *et ál.*¹⁷⁵, Derksen *et ál.*¹⁰⁸, Millar *et ál.*¹⁰⁹ y Copelan *et ál.*¹⁹¹ y la primera comunicación de los resultados de Pecora *et ál.* en 68 pacientes¹⁶⁸ establecen un único punto de corte en su serie para recomendar dosis de CD34+/33- superiores a $0,86 \times 10^6/\text{kg}$, $2,79 \times 10^6/\text{kg}$, $1,38 \times 10^6/\text{kg}$, $1,2 \times 10^6/\text{kg}$ y $1 \times 10^6/\text{kg}$ respectivamente. Bajo nuestro punto de vista, es preciso disponer de un número suficiente de pacientes y establecer más de un punto de corte en la serie para comprobar la ventaja de

distintos intervalos de dosis. Pecora *et ál.*¹⁷⁴, en su serie de 410 pacientes, encuentran como nosotros una diferencia discreta en términos absolutos pero estadísticamente significativa al comparar los pacientes que reciben entre $1,5$ y $5 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+/33- con los que reciben más de $5 \times 10^6/\text{kg}$. Sólo encuentran un posible efecto-meseta con dosis todavía mayores, no siendo significativa la diferencia entre 5 y $7,5 \times 10^6/\text{kg}$. Otra observación interesante de este trabajo es el retraso en el injerto granulocítico y plaquetar en aquellos pacientes con una dosis considerable de células CD34+ totales pero inferior a $1 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+/33-. En el caso más extremo, un pequeño subgrupo de 11 pacientes con dosis de CD34+ entre $2,3$ y $10,1 \times 10^6/\text{kg}$ pero con niveles indetectables de CD34+/33- experimentan un retraso muy considerable del tiempo de injerto. Tres de ellos no llegan a alcanzar la cifra de $50 \times 10^9/\text{l}$. La conclusión de estos autores, totalmente coherente con los resultados obtenidos por nosotros, es que una dosis óptima de PH para un trasplante debe contener más de $1 \times 10^6/\text{kg}$ células CD34+/33-, independientemente de la dosis de CD34+ total.

4 – INJERTO EN PACIENTES TRASPLANTADOS CON BAJAS DOSIS DE PH

En nuestro trabajo hemos analizado la cinética de injerto en el grupo de pacientes trasplantados con una cantidad extremadamente baja de PH. Como comentamos anteriormente, nuestra serie incluye los primeros trasplantes realizados en la institución, en un momento en que la recolección de PH se basaba en los recuentos de CMN. Por ello, algunos pacientes fueron trasplantados con dosis mucho menores de las perseguidas hoy en día. En este grupo de 29 pacientes, que habían recibido una mediana de $0,53 \times 10^6/\text{kg}$ células CD34+/33-, la probabilidad de recuperación granulocítica a las tres semanas fue del 97% y la de recuperación plaquetar a las cuatro semanas del 76%. Otros trabajos que analizan subpoblaciones trasplantadas con cifras bajas de PH encuentran resultados parecidos: casi todos los pacientes alcanzan el injerto granulocítico y la mayoría el injerto plaquetar, aunque con retrasos de entre unos días y varias semanas y con una incidencia algo mayor de complicaciones^{172, 192-195}. Dos estudios que realizan un seguimiento a largo plazo de los pacientes no detectan fallos secundarios de injerto en estos grupos de pacientes^{194, 195}. Watts *et ál.*¹⁹² encuentran como la infusión de un producto celular obtenido de médula ósea no mejora significativamente la cinética de injerto en estos pacientes.

Sí que es preciso llamar la atención sobre la mayor mortalidad encontrada en los pacientes trasplantados con dosis bajas de PH. En nuestra serie cinco pacientes de un total de 29 fallecieron antes del injerto plaquetar, cuatro de forma precoz y el otro durante el sexto mes postrasplante. Aunque uno de los fallecimientos se debió a progresión leucémica es correcto incluirlos todos como *mortalidad relacionada con el trasplante*. En este subgrupo ascendió al 17,2 % de los pacientes, frente a un 3,2 % en el resto de la serie. Bensinger *et ál.*¹⁷⁰ encuentran unas cifras similares, aunque con un umbral de PH infundidos muy diferente: 17,6 % en los pacientes que reciben menos de $5 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+ totales frente a un 4,6 % en el resto de la serie.

Bajo nuestro punto de vista estos resultados conducen a una idea: llevar a cabo un trasplante con un número bajo de PH es viable, aunque asumiendo un riesgo importante de retraso en el injerto, especialmente plaquetar, y de una mayor mortalidad asociada. El clínico debe valorar en su justa medida el balance entre riesgos y beneficios en aquellos pacientes en que la recolección de una cantidad óptima de progenitores no es posible. Hoy en día, la disponibilidad nuevos regímenes de movilización con citoquinas como el stem cell factor permite "rescatar" un número cada vez mayor de pacientes en los que han fracasado los intentos movilizados tradicionales¹⁹⁶⁻¹⁹⁸.

5 – PREDICCIÓN DE LA RECOLECCIÓN DE PH

Los factores con mayor poder predictivo de la cantidad de células CD34+/33- recolectadas fueron la cifra absoluta de CD34+/33- en SP el quinto día de movilización y el porcentaje de estas células ese mismo día respecto del total de leucocitos. Aunque deja un 13% de la variabilidad sin explicar, el modelo de regresión basado únicamente en el recuento de CD34+/33- en SP fue capaz de predecir de forma sencilla el producto recolectado en tres de los cuatro subgrupos en que se dividió el grupo de validación. No hemos encontrado ningún otro estudio en la literatura que utilice el recuento o el porcentaje de células CD34+/33- para predecir el resultado de la recolección de PH. En contraste, varios estudios muestran la correlación entre el recuento de células CD34+ totales en SP y el número de CD34+ ó CFU-GM recolectadas¹⁹⁹⁻²⁰⁵.

Junto a los niveles de CD34+/33- en SP, otros factores resultaban significativos en el estudio de regresión lineal múltiple. El modelo que contenía 7 variables fue capaz de explicar hasta el 97% de la variabilidad. Sin embargo, los factores que cuantifican el efecto de la movilización son capaces de predecir por sí solos casi todo, y su presencia en el modelo puede ocultar o distorsionar la influencia de otras variables. Ello puede explicar la paradójica positividad del coeficiente de la variable "número de ciclos recibidos" o la negatividad del de la variable "infiltración medular previa", que naturalmente contradicen lo mostrado en el análisis univariante. Para mejor explorar el papel de estos parámetros realizamos un nuevo análisis de regresión múltiple prescindiendo de las variables postmovilización. El resultado fue un modelo con una R²c discreta, pero que permite demostrar la influencia independiente de tres variables: el recuento de CD34+/33- en SP basal (premovilización), el número de ciclos recibidos con anterioridad, esta vez con coeficiente negativo (más ciclos supondrían una recolección peor) y el diagnóstico de linfoma (con coeficiente negativo igualmente).

6 – FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA MOVILIZACIÓN Y RECOLECCIÓN DE PH

Los tres factores que en nuestro análisis demuestran una influencia independiente sobre la movilización tienen un alto grado de coincidencia con los anteriores: la cifra de células CD34+/33- en SP basal, el número de ciclos previos y el diagnóstico, en este caso de cáncer de mama y con coeficiente positivo. Resulta evidente que el resultado de la movilización y el de la recolección celular se encuentran íntimamente ligados. Ni siquiera la eventualidad de una aféresis problemática alteró de forma significativa esta relación.

No hay ningún estudio multivariante en la literatura que analice los factores que influyen sobre la recolección o la movilización de células CD34+/33-. Dos estudios univariantes resaltan la influencia negativa que, al igual que sucede en nuestra serie, supone el volumen de quimioterapia recibido con anterioridad para la recolección de CD34+/33-^{174, 188}. Varios análisis multivariantes encuentran asimismo una relación independiente entre este factor y la recolección de células CD34+ totales^{170, 186, 188, 205-206}. En nuestra experiencia, incluso un único ciclo a dosis convencional de un fármaco alquilante tóxico para los PH como la carmustina compromete de forma importante la movilización con filgrastim respecto de un grupo similar de pacientes no tratados²⁰⁷. Otros dos estudios encuentran por su parte una influencia significativa positiva del diagnóstico de cáncer de mama sobre el número de CD34+ total^{170, 206}, hallazgo igualmente concordante con nuestros resultados.

Varios trabajos encuentran una relación significativa en el análisis multivariante entre el tratamiento previo con radioterapia y la recolección de CD34+ total^{170, 182, 188, 205}. Dos de estos estudios comprenden únicamente pacientes con linfoma, uno pacientes con mieloma y el restante pacientes con varios diagnósticos en el que la mitad de la serie son neoplasias linfoides. Al realizar en nuestra serie un estudio multivariante de factores que influyen sobre la recolección de células CD34+/33- únicamente en el grupo de linfomas la radioterapia es uno de las dos

variables significativas, junto con la cifra de CD34+/33- en SP (datos no mostrados). Estos resultados parecen indicar que la variable "radioterapia previa" en una serie de pacientes con distintos tumores puede ser excesivamente heterogénea. La radioterapia que reciben los pacientes con linfoma puede ser un factor con mayor influencia sobre la movilización y recolección ulterior que la irradiación locorregional habitual en las pacientes con cáncer de mama.

El recuento de células CD34+/33- en la SP basal es el factor con mayor poder predictivo de la movilización en nuestra serie, al igual que lo es del número de células recolectadas en el modelo que prescinde de los recuentos postmovilización. Aunque ninguno analiza la subpoblación CD34+/33-, varios estudios encuentran una relación entre la cifra basal de células CD34+ totales en SP premovilización y el resultado de la movilización y la recolección, tanto en donantes para trasplante alogénico como en pacientes movilizados con distintas pautas^{127, 202, 208-210}. De cualquier manera, aunque el recuento basal en SP proporcione una estimación de los resultados esperables, gran parte de la variabilidad queda sin explicar, por lo que hay que ser cauteloso en la utilización de este parámetro para la toma de decisiones clínicas.

CONCLUSIONES

- 1 La dosis de progenitores hematopoyéticos es el factor que influye de forma más significativa sobre los tiempos de recuperación granulocítica y plaquetar tras el trasplante autólogo de células progenitoras de sangre periférica.
- 2 El recuento de células CD34+/33- es un estimador rápido, fiable y consistente del número de progenitores hematopoyéticos y por tanto de la calidad del producto celular trasplantado. La *dosis óptima recomendable* de células CD34+/33- para un trasplante es de $2,5 \times 10^6/\text{kg}$ o superior. Una dosis comprendida entre 1 y $2,5 \times 10^6/\text{kg}$ puede considerarse adecuada en pacientes seleccionados que presenten dificultades para la recolección de cantidades mayores.
- 3 La dosis de CFU-GM trasplantadas se correlaciona satisfactoriamente con la cinética de injerto, presentando una influencia significativa independiente de la dosis de células CD34+/33-. En las condiciones utilizadas para nuestro estudio, resulta un estimador adecuado y consistente de la calidad del producto celular, aunque su utilidad clínica viene limitada por el largo plazo necesario para obtener los resultados.
- 4 Los recuentos automáticos de células totales y de células mononucleares presentan una correlación insuficiente con la cinética de injerto, y por tanto no deben emplearse como estimadores de la calidad del producto celular. La cuantificación de células mononucleares basada en el recuento diferencial microscópico ofrece pequeñas ventajas respecto del recuento automático, pero es asimismo un estimador inadecuado de la calidad del producto.
- 5 El trasplante con dosis de progenitores claramente inferiores a las consideradas adecuadas se asocia con un retraso global del injerto hematopoyético y una mortalidad relacionada cercana al 15%. En aquellos

pacientes en que no sea posible recolectar una dosis superior tras más de una movilización y en los que los beneficios esperables del trasplante sean superiores a los de cualquier otra alternativa y compensen tal cuota de riesgo puede considerarse esta posibilidad.

- 6 Con independencia de la dosis de progenitores hematopoyéticos trasplantados, la persistencia de enfermedad activa en el momento del trasplante se asocia con un injerto hematopoyético más lento y con un mayor consumo de hemoderivados.
- 7 La cantidad de tratamiento quimioterápico recibido por los pacientes con anterioridad al trasplante influye negativamente sobre la cinética de injerto y se asocia con un mayor consumo de hemoderivados.
- 8 Independientemente de la dosis de progenitores hematopoyéticos trasplantados, el trasplante autólogo en las pacientes con carcinoma de mama se asocia con una recuperación granulocítica más precoz que en el caso de las neoplasias linfoides.
- 9 En las pacientes con carcinoma de mama, la utilización de un esquema de escalada de dosis a partir del régimen de acondicionamiento STAMP-V se asocia de forma independiente con un discreto retraso en la recuperación granulocítica.
- 10 La edad del paciente influye negativamente sobre el tiempo de injerto plaquetar en los pacientes con mieloma múltiple. En contraste, la edad no parece influir significativamente sobre la recuperación plaquetar de pacientes con otros tumores ni sobre la recuperación granulocítica.
- 11 La administración de factores de crecimiento hematopoyéticos postrasplante en pacientes con neoplasias linfoides se asocia con una recuperación granulocítica más precoz. El diseño de nuestro estudio no

permite extraer conclusiones sobre su efecto en pacientes con tumores sólidos.

- 12** Es posible realizar una estimación fiable de la dosis de células CD34+/33- que se podrán recolectar en función únicamente del recuento de dicha subpoblación en sangre periférica después de la movilización.
- 13** Cabe esperar una mejor repuesta a la movilización en aquellos pacientes que hayan recibido con anterioridad un menor volumen de tratamiento quimioterápico y en las pacientes con cáncer de mama. Con independencia de estas variables, el recuento de células CD34+/33- en la sangre periférica basal se correlaciona con el resultado de la movilización.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 - Thomas ED, Storb R. The development of the scientific foundation of hematopoietic cell transplantation based on animal and human studies. En: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, editores. Hematopoietic Cell Transplantation. 2nd ed. Malden: Blackwell Science; 1999. p. 1-11.
- 2 - Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Eldredge JH. Recovery from radiation injury. Science 1951; 113: 510-11.
- 3 - Lorenz E, Umhoff D, Reid TY, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. J Natl Cancer Inst 1951; 12: 197-201.
- 4 - Barnes D, Loutit JF. What is the recovery factor in the spleen?. 1954. Nucleonics 12: 68. *Citado en: Buckner CD. Autologous bone marrow transplants to hematopoietic stem cell support with peripheral blood stem cells: a historical perspective. J Hematother 1999; 8(3): 233-6.*
- 5 - Ferrebee JW, Lochte HL, Asheley CA, Thomas ED. Successful marrow homograft in the dog after irradiation. Surgery 1958; 43: 516-20.
- 6 - Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. N Eng J Med 1957; 257: 491-6.
- 7 - Mathe G, Jammet H, Pendic B *et ál.* Transfusions et greffes de moelle osseuse homologue chez des humains irradiés a haute dose accidentellement. Rev Franc Etudes Clin Biol 1959; IV: 226-38. (*Citado en Thomas ED, Storb R. The development of the scientific foundation of hematopoietic cell transplantation based on animal and human studies. En: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, editores. Hematopoietic Cell Transplantation. 2nd ed. Malden: Blackwell Science; 1999. p. 1-11.*)

- 8 - Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hoon R, Good, RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968; 2: 1366.
- 9 - Thomas ED, Briant JI, Buckner CD *et ál.* Allogeneic marrow grafting using HL-A match donor -recipient sibling pairs. *Trans Assoc AM Physicians* 1971; 84: 248-61. (*Citado en Thomas ED, Storb R. The development of the scientific foundation of hematopoietic cell transplantation based on animal and human studies. En: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, editores. Hematopoietic Cell Transplantation. 2nd ed. Malden: Blackwell Science; 1999. p. 1-11.*)
- 10 - Thomas ED, Lochete HL, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* 1959; 38: 1709-16.
- 11 - Ferrebee JW, Billen D, Urso IM *et ál.* Preservation of radiation recovery factor in frozen marrow. *Blood* 1957; 12: 1096.
- 12 - Lovelock J, Bishop W. Prevention of freezing damage to living cells by DMSO. *Nature* 1959; 183: 1394.
- 13 - Kurnick N, Montano A, Gerdes J. Preliminary observations on the treatment of posirradiation hematopoietic depression in man by the infusion of autogenous bone marrow. *Ann Intern Med* 1958; 49: 973.
- 14 - McGovern JJ, Russel PS, AtkinsL, Webster EW. Treatment of terminal leukemic relapse by total-body irradiation and intravenous infusion of stored autologous bone marrow obtained during remission. *N Eng J Med* 1959; 260: 675-83.

- 15 - Maximow A. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im posfetalen Leben der Säugetiere. *Folia Haematol (Lpz)* 1909;8. (Citado en: *Korbling M, Fliedner TM. History of blood stem cell transplants. En: Gale RP, Juttner C, Henon P, editores. Blood Stem Cell Transplants. Cambridge: Cambridge University Press; 1994. p. 9-19.*)
- 16 - Korbling M, Fliedner TM. History of Blood Stem Cell Transplants. En Gale RP, Juttner C, Henon P. Editores. *Blood Stem Cell Transplants. Cambridge: Cambridge University Press; 1994. p. 9-19.*
- 17 - Goodman JW, Hodgson GS. Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood* 1962; 19: 702-14.
- 18 - Cavins JA, Scheer SC, Thomas ED, Ferrebee JW. The recovery of lethally irradiated dogs given infusiones of autologous leukocytes preserved at -80 C. *Blood* 1964; 23: 38-43.
- 19 - McCreddie KB, Hersh EM, Freireich EJ. Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science* 1971; 171: 293-4.
- 20 - Goldman JM, Catovsky D, Galton DA. Reversal of blast-cell crisis in CGL by transfusion of stored autologous buffy-coat cells. *Lancet* 1978 Feb 25; 1(8061): 437-8.
- 21 - Goldman JM, Catovsky D, Goolden AW, Johnson SA, Galton DA. Buffy coat autografts for patients with chronic granulocytic leukaemia in transformation. *Blut* 1981 Mar; 42(3): 149-55.
- 23 - Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Weisenburger DD. Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells. *Exp Hematol* 1986 Mar; 14(3): 192-6.

- 24 - Castaigne S, Calvo F, Douay L, Thomas F, Benbunan M, Gerota J, Degos L. Successful haematopoietic reconstitution using autologous peripheral blood mononucleated cells in a patient with acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1986 May; 63(1): 209-11.
- 25 - Bell AJ, Figes A, Oscier DG, Hamblin TJ. Peripheral blood stem cell autografting. *Lancet* 1986; 1(8488): 1027.
- 26 - Korbling M, Dorken B, Ho AD, Pezzutto A, Hunstein W, Fliedner TM. Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood* 1986; 67(2): 529-32.
- 27 - Tilly H, Bastit D, Lucet JC, Esperou H, Monconduit M, Piguet H. Haemopoietic reconstitution after autologous peripheral blood stem cell transplantation in acute leukaemia. *Lancet* 1986; 2(8499): 154-5.
- 28 - Reiffers J, Bernard P, David B, Vezon G, Sarrat A, Marit G, Moulinier J, Broustet A. Successful autologous transplantation with peripheral blood hemopoietic cells in a patient with acute leukemia. *Exp Hematol* 1986; 14: 312-5.
- 29 - Kessinger A. Utilization of peripheral blood stem cells in autotransplantation. *Hematol Oncol Clin North Am* 1993; 7(3): 535-45.
- 30 - Richman CM, Weiner RS, Yankee RA. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood* 1976; 47(6): 1031-9.
- 31 - To LB, Haylock DN, Kimber RJ, Juttner CA. High levels of circulating haemopoietic stem cells in very early remission from acute non-lymphoblastic leukaemia and their collection and cryopreservation. *Br J Haematol* 1984; 58(3): 399-410.

- 32 - Siena S, Bregni M, Brando B *et ál.* Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1989; 74: 1905-14.
- 33 - Sheridan WP, Begley CG, Juttner CA *et ál.* Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilized by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Lancet* 1992; 339: 640-4.
- 34 - Siena S, Bregni M, Brando B *et ál.* . Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood* 1991; 77: 400-9.
- 35 - Martín M. High-dose chemotherapy for breast cancer: clinical advantages of autologous peripheral blood progenitor cells compared with autologous bone marrow transplantation. *Ann Oncol* 1995; 6 (Suppl 4): S33-S37.
- 36 - Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H, Hermans J. Blood and marrow transplantation activity in Europe 1996. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant* 1998; 22(3): 227-40.
- 37 - Organización Nacional de Trasplantes. Estadísticas sobre actividad en trasplante de progenitores hematopoyéticos en España. <http://www.msc.es/ont/esp/estadisticas/medula/tph.pdf> (acceso el 16-9-2002).
- 38 - Flowers ME, Parker PM, Johnston LJ *et ál.* Comparison of chronic graft-versus-host disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. *Blood*. 2002; 100(2): 415-9.

- 39 - Urbano-Ispizua A, Schmitz N, de Witte T *et ál.* Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumors and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: 639-46.
- 40 - Burnett AK, Goldstone AH, Stevens RMF *et ál.* Randomised comparison of addition of autologous bone marrow transplantation to intensive chemotherapy for acute myeloid leukaemia in first remission: results of MRC AML 10 Trial. *Lancet* 1998; 351: 700-08.
- 41 - Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R *et ál.* Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. *N Eng J Med* 1995; 332: 217-23.
- 42 - Harrousseau JL, Cahn JY, Pignon B *et ál.* Comparison of autologous bone marrow transplantation and intensive chemotherapy as postremission therapy in adult acute myeloid leukemia. *Blood* 1997; 90: 2978-86.
- 43 - Cassileth PA, Harrington DP, Appelbaum FR *et ál.* Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. *N Eng J Med* 1998; 339: 1649-56.
- 44 - Hoyle C, Gray R, Goldman J. Autografting for patients with CML in chronic phase: an update. *Br J Haematol.* 1994; 86: 76.
- 45 - Carella AM, Cunningham I, Lerma E *et ál.* Mobilization and transplantation of Philadelphia-negative peripheral blood progenitor cells early in chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1575.
- 46 - Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H *et ál.* Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia

- and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med.* 2001; 344(14): 1038-42.
- 47 - Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ *et ál.* Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2001; 344(14): 1031-7.
- 48 - Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A *et ál.* Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med.* 2002; 346(9): 645-52.
- 49 - Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H, Hermans J. Blood and marrow transplantation activity in Europe 1997. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 231-45.
- 50 - Philip T, Guglielmi C, Hagenbeck A *et ál.* Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Eng J Med* 1995; 333: 1440-5.
- 51 - Haioun C, Lepage E, Gisselbretch C *et ál.* Survival benefit of high-dose therapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma: final analysis of the prospective LNH87-2 protocol-a Groupe d'Etude de Lymphomes de l'Adulte study. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3025-30.
- 52 - Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's Disease. *New Eng J Med* 1998; 339: 1506-14.
- 53 - Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM *et ál.* A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med.* 1996 Jul 11;335(2):91-7.

- 54 - Fermand JP, Ravaud P, Chevret S *et ál.* High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma: up-front of rescue treatment? Results of a multicenter sequential randomized clinical trial. *Blood* 1998; 92: 3131-6.
- 55 - Peters WP, Shpall EJ, Jones RB *et ál.* High-dose combination alkylating agents with bone marrow support as initial treatment for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1988; 6: 1368-76.
- 56 - Antman K, Ayash L, Elias A *et ál.* A phase II study of high-dose cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin qieht autologous marrow support in women with measurable advanced breast cancer responding to standard-dose therapy. *J Clin Oncol* 1992; 10: 102-10.
- 57 - Antman KH, Rowlings PA, Vaughan WP, *et ál.* High-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem-cell support for breast cancer in North America. *J Clin Oncol* 1997; 15(5): 1870-9.
- 58 - Hortobagyi GN, Buzdar AU, Theriault RL *et ál.* Randomized trial of high-dose chemotherapy and blood cell autografts for high-risk primary breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Feb 2;92(3):225-33.
- 59 - Stadmauer EA, O'Neill A, Goldstein LJ *et ál.* Conventional-dose chemotherapy compared with high-dose chemotherapy plus autologous hematopoietic stem cell transplantation for metastatic breast cancer. *N Eng J Med* 2000; 342: 1069-76.
- 60 - Bergh J, Wiklund T, Erikstein B *et ál.* Tailored fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide compared with marrow-supported high-dose chemotherapy as adjuvant treatment for high-risk breast cancer: a randomised trial. Scandinavian Breast Group 9401 study. *Lancet.* 2000; 356(9239): 1384-91.

-
- 61 - Weiss RB, Gill GG, Hudis CA. An on-site audit of the South African Trial of High-Dose Chemotherapy for Metastatic Breast Cancer and associated publications. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2771-7.
- 62 - Esteva F, Valero V, Puszai L *et ál.* Chemotherapy of metastatic breast cancer: what to expect in 2001 and beyond. *The Oncologist* 2001; 6: 133-46.
- 63 - Jantunen E, Myllykangas-Luosujärvi R. Stem cell transplantation for treatment of severe autoimmune diseases: current status and future perspectives. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 351.
- 64 - Slavin S, Nagler A, Naparstek E *et ál.* Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 1998; 91: 756-63.
- 65 - Pérez-Calvo J, Martínez-Aguillo M, García-Rayó S *et ál.* Factors determining the actual received dose intensity in a program of multicyclic dose-intensive alternating chemotherapy with sequential stem cell support. *Acta Haematologica* 2001; 105: 137-42.
- 66 - García-Rayó S, Pérez-Calvo J, Martín Algarra S *et ál.* Multiple cycles of dose-intensive chemotherapy with repeated stem cell support as induction treatment in metastatic breast cancer: a feasibility study. *Bone Marrow Transplantation* 2001; 28: 235-242.
- 67 - Pettengell R, Woll PJ, Thatcher N, Dexter TM, Testa NG. Multicyclic, dose-intensive chemotherapy supported by sequential reinfusion of hematopoietic progenitors in whole blood. *J Clin Oncol* 1995; 13(1): 148-56.

- 68 - Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 52-8.
- 69 - Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; 4(3): 328-32.
- 70 - Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM *et ál.* Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party on Chronic Leukemia. *Blood* 1995; 86(5): 2041-50.
- 71 - Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD *et ál.* Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321(17): 1174-8.
- 72 - Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A *et ál.* Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med* 1997; 337(6): 373-81.
- 73 - Hansen JA, Gooley TA, Martin PJ, Appelbaum F, Chauncey TR, Clift RA, Petersdorf EW, Radich J, Sanders JE, Storb RF, Sullivan KM, Anasetti C. Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1998; 338(14): 962-8.
- 74 - Alfonso AAC, DeUgarte D, Zuk PA *et ál.* Differences between multilineage cells isolated from bone marrow and adipose tissue. Proceedings of the Eight Annual Meeting of the International Society for Cellular Therapy (formerly ISHAGE). Barcelona, 25-28 Mayo 2002: 40.

- 75 - Brugger W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated ex vivo. *N Engl J Med* 1995; 333(5): 283-7.
- 76 - Reiffers J, Cailliot C, Dazey B, Attal M, Caraux J, Boiron JM. Abrogation of post-myeloablative chemotherapy neutropenia by ex-vivo expanded autologous CD34-positive cells. *Lancet* 1999; 354: 1092-3.
- 77 - Gribben JG, Freedman AS, Neuberg D *et ál.* Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1991; 325(22): 1525-33.
- 78 - Pérez-Calvo J, Martín Algarra S, García Rayo S *et ál.* Evaluation of the Isolex 300i device for positive and simultaneous positive/negative selection. Fourth International Meeting of the International Society for Hematotherapy and Graft Engineering. Baltimore, June 4-7 1998. *J Hematother* 1998; 7: 279.
- 79 - Kerr WG. Genetic modification of the hematolymphoid compartment for therapeutic purposes. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12(3): 503-18.
- 80 - Koc ON, Gerson SL, Cooper BW *et ál.* Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999; 18: 307-16.
- 81 - Aversa F, Tabilio A, Velardi A *et ál.* Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med* 1998; 339(17): 1186-93.

- 82 - Pérez A, Pérez-Calvo J, Herreros J *et ál.* *In vitro* culture of muscle derived stem cells for application in human cardiac regenerative therapy by means of cellular cardiomyoplasty. Proc of the Eighth Annual Meeting of the International Society for Cellular Therapy. Barcelona, 25-28 Mayo 2002:40.
- 83 - Menasche P, Hagege AA, Scorsin M *et ál.* Myoblast transplantation for heart failure. Lancet. 2001 Jan 27;357(9252):279-80.
- 84 - Tsai RJF, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. N Engl J Med 2000; 343: 86-93.
- 85 - Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. Nature. 2002; 417(6884): 39-44.
- 86 - Graf T. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. Blood. 2002; 99(9): 3089-101.
- 87 - Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL *et ál.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature. 2002; 418(6893): 41-9.
- 88 - Schwartz RE, Reyes M, Koodie L *et ál.* Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. J Clin Invest. 2002 May;109(10):1291-302.
- 89 - Lansdorp PM. Molecular aspects of stem cell renewal. En: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, editores. Hematopoietic Cell Transplantation. 2nd ed. Malden: Blackwell Science; 1999. p. 48-57.
- 90 - Eaves CJ, Eaves AC. Stem and progenitor cells in the blood. En Gale RP, Juttner C, Henon P. Editores. Blood Stem Cell Transplants. Cambridge: Cambridge University Press; 1994. p. 20-31.

- 91 - Luider J, Brown C, Selinger S *et ál.* Factors influencing yields of progenitor cells for allogeneic transplantation: potimization of G-CSF dose, day of collection and duration of leukapheresis. *J Hematother* 1997; 6: 575-80.
- 91 - Metcalf D Mechanisms of Human Hematopoiesis En: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, editores. *Hematopoietic Cell Transplantation*. 2nd ed. Malden: Blackwell Science; 1999. p. 58-62.
- 92 - Jones RJ, Celano P, Sharkis SJ, Sensenbrenner LL Two phases of engraftment established by serial bone marrow transplantation in mice. *Blood* 1989; 73(2): 397-401.
- 93 - Tricot G, Gazitt Y, Leemhuis T *et ál.* Collection, tumor contamination and engraftment kinetics of highly purified hematopoietic progenitor cells to support high dose therapy in multiple myeloma. *Blood* 1998; 91: 4489-95.
- 94 - Charbord P. Stroma and hematopoiesis. En: Wunder EW, Henon PR, editores. *Peripheral blood stem cell autografts*. Berlin: Springer-Verlag; 1993. P 35-46.
- 95 - Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: Structure, biology and clinical utility. *Blood* 1996; 87: 1-13.
- 96 - Verfaillie CM, Ploemacher R, Di Persio J *et ál.* ISHAGE Scientific Committee Report: Assays to Determine Hematopoietic Stem Cell Content in Blood or Marrow Grafts. *Cytotherapy* 1999; 1: 41-9.
- 97 - Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996; 273(5272): 242-5.

- 98 - Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M. Human bone marrow CD34⁻ cells engraft *in vivo* and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34⁺ cells. *Exp Hematol* 1998; 26(4): 353-60.
- 99 - Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nature Med* 1998; 4: 1038-45.
- 100 - Nakauchi H. Hematopoietic stem cells: Are they CD34-positive or CD34-negative? *Nature Med* 1998; 4: 1009-10.
- 101 - Sato T, Laver JH, Ogawa M. Reversible Expression of CD34 by Murine Hematopoietic Stem Cells. *Blood* 1999; 94: 2548-54.
- 102 - Goodell MA. CD34⁺ or CD34: Does it Really Matter? *Blood* 1999; 94: 2545-2547.
- 103 - Andrews RG, Singer JW, Bernstein I. Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. *J Exp Med* 1989; 169: 1721-31.
- 104 - Sakabe H, Ohmizono Y, Tanimukai S *et al*. Functional differences between subpopulations of mobilized peripheral blood-derived CD34⁺ cells expressing different levels of HLA-DR, CD33, CD38, and c-kit antigens. *Stem Cells* 1997; 15: 73-81.
- 105 - Verfaillie CM, Miller JS. CD34⁺/33⁻ cells reselected from macrophage inflammatory protein 1 α + interleukin-3-supplemented "stroma-noncontact" cultures are highly enriched for long-term bone marrow culture initiating cells. *Blood* 1994; 84: 1442-9.

- 106 - To LB, Haylock DN, Dowse T *et ál.* A comparative study of the phenotype and proliferative capacity of peripheral blood CD34+ cells mobilized by four different protocols and those of steady-phase PB and bone marrow CD34+ cells. *Blood* 1994; 84: 2930-9.
- 107 - Möhle R, Pförsich M, Fruehauf S *et ál.* Filgrastim post chemotherapy mobilizes more CD34+ cells with a different antigenic profile compared with use during steady-state hematopoiesis. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 827-32.
- 108 - Derksen MW, Rodenhuis S, Dirkson MKA *et ál.* Subsets of CD34+ cells and rapid hematopoietic recovery after peripheral blood stem cell transplantation. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1922-32.
- 109 - Millar BC, Millar JL, Shepherd V *et ál.* The importance of CD34+/CD33- cells in platelet engraftment after intensive therapy for cancer patients given peripheral blood stem cell rescue. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 469-75.
- 110 - Tjønnfjord GE, Steen R, Evensen SA, Thorsby E, Egeland T. Characterization of CD34+ peripheral blood cells from healthy adults mobilized by recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Blood* 1994; 84: 2795-801.
- 111 - Bender JG, Williams SF, Myers S *et ál.* Characterization of chemotherapy mobilized peripheral blood progenitor cells for use in autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1992; 10: 281-5.
- 112 - Syrjälä M, Ruutu T, Jansson SE. A flow cytometric assay of CD34-positive cell populations in the bone marrow. *Br J Haematol* 1994; 88: 679-84.

- 113 - Serke S, Arseniev L, Watts M *et ál.* Imprecision of counting CFU-GM colonies and CD34-expressing cells. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 57-61.
- 114 - Bolwell BJ, Pohlman B, Andersen S, *et ál.* Delayed G-CSF after autologous progenitor cell transplantation: A prospective randomized trial. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 369-73.
- 115 - Johnsen HE. Toward a worldwide standard for CD34+ enumeration? *J Hematother* 1997; 6(2): 83-9.
- 116 - Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *J Hematother.* 1996;5(3):213-26.
- 117 - Gratama JW, Orfao A, Barnett D *et ál.* Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry* 1998; 34(3): 128-42.
- 118 - Johnsen HE, Baech J, Nikolajsen K. Validation of the Nordic flow cytometry standard for CD34+ cell enumeration in blood and autografts: report from the third workshop of the Nordic Stem Cell Laboratory Group. *J Hematother* 1999; 8(1): 15-28.
- 119 - Wunder E. Short term colony assay for CFU-GM. En: Wunder EW, Henon PR, editores. *Peripheral blood stem cell autografts.* Berlin: Springer-Verlag; 1993. P 128-31.
- 120 - Lamana M, Albella B, Rodriguez F, Regidor C, Bueren JA Conclusions of a national multicenter intercomparative study of *in vitro* cultures of human hematopoietic progenitors. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23(4): 373-80.

- 121 - Ploemacher RE, van der Sluijs JP, Voerman JS, Brons NH. An *in vitro* limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood* 1989; 74(8): 2755-63.
- 122 - Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis *in vitro*. *Blood* 1989; 74(5): 1563-70.
- 123 - McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematology differentiation and function. *Science* 1988; 241(4873): 1632-9.
- 124 - Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H *et ál.* Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med* 1996; 2(12): 1329-37.
- 125 - Srour EF, Zanjani ED, Cornetta K, Traycoff CM, Flake AW, Hedrick M, Brandt JE, Leemhuis T, Hoffman R Persistence of human multilineage, self-renewing lymphohematopoietic stem cells in chimeric sheep. *Blood* 1993; 82(11): 3333-42.
- 127 - Brown RA, Adkins D, Goodnough LT *et ál.* Factors that influence the collection and engraftment of allogeneic peripheral-blood stem cells in patients with hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 1997; 9: 3067-74.
- 128 - Prosper F, Arbona C, Benet I. Movilización de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica: bases biológicas y utilización clínica. *Hematol Citocinas Inmunoter Ter Cel* 1998; 1: 39-58.
- 129 - To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 1997; 89(7): 2233-58.

- 130 - Del Cañizo MC, Vallejo C, Lopez N. Los cultivos celulares en el estudio de las hemopatías malignas. *Sangre* 1996; 41(4): 297-303.
- 131 - To LB, Haylock D, Dyson P, Simmons P, Juttner C. Chemotherapy-Based approaches to mobilization of progenitor cells. En Morstin G, Sheridan W, editores. *Cell therapy. Stem cell transplantation, gene therapy and cellular immunotherapy*. Cambridge: Cambridge University Press; 1996. P 130-45.
- 132 - Schwartzberg LS, Birch R, Hazelton B *et ál.* Peripheral blood stem cell mobilization by chemotherapy with and without recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *J Hematother* 1992; 1(4): 317-27.
- 133 - Fukuda M, Kojima S, Matsumoto K, Matsuyama T. Autotransplantation of peripheral blood stem cells mobilized by chemotherapy and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in childhood neuroblastoma and non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 1992 Mar; 80(3): 327-31.
- 134 - Brugger W, Bross K, Frisch J, Dern P, Weber B, Mertelsmann R, Kanz L. Mobilization of peripheral blood progenitor cells by sequential administration of interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor following polychemotherapy with etoposide, ifosfamide, and cisplatin. *Blood* 1992; 79(5): 1193-200.
- 135 - Duhrsen U, Villeval JL, Boyd J, Kannourakis G, Morstyn G, Metcalf D. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 1988; 72(6): 2074-81.
- 136 - Prosper F, Stroncek D, Verfaillie CM. Phenotypic and functional characterization of long-term culture-initiating cells present in peripheral blood progenitor collections of normal donors treated with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1996; 88: 2033-42.

- 137 - Alegre A, Tomas JF, Martinez-Chamorro C *et ál.* Comparison of peripheral blood progenitor cell mobilization in patients with multiple myeloma: high-dose cyclophosphamide plus GM-CSF vs G-CSF alone. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20(3): 211-7.
- 138 - Desikan KR, Barlogie B, Jagannath S *et ál.* Comparable engraftment kinetics following peripheral-blood stem-cell infusion mobilized with granulocyte colony-stimulating factor with or without cyclophosphamide in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 1998; 16(4): 1547-53.
- 139 - Pérez-Calvo J, Fernández Hidalgo O, Martín Algarra S *et ál.* Successful transplantation of non-frozen, liquid-culture preserved blood stem cells to support high-dose therapy in solid tumors. *Blood* 1996; 88 (10, suppl 1): 411a.
- 140 - Lamana Luzuriaga ML. Trasplante autólogo de médula ósea: efecto sobre el injerto de la manipulación de las células hematopoyéticas y de las variables clínicas. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, 1996.
- 141 - Farrant J, Woolgar A. Possible relationship between the physical properties of solutions and cell damage during freezing. En: Wollstenholme G, O'connor M, Churchill A, editores. *The frozen cell*. London 1970. P. 97-114.
- 142 - Meryman H. Cryoprotective agents. *Cryobiology* 1971; 8: 173-83.
- 143 - Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Criobiology* 1977; 14: 251-72.
- 144 - Lamana M, Regidor C, Bornstein R, Clemente B, Castro M. Criopreservación de médula ósea. *Sangre* 1990; 35: 451-8.
- 145 - Re A, Vijayaraghavan K, Basade MM, He S, Gulati SC. Long-term cryopreservation: successful trilineage engraftment after autologous bone

- marrow transplantation with bone marrow cryopreserved for seven years. *J Hematother* 1998; 7:185-8.
- 146 - Hernández-Navarro F, Ojeda E, Arrieta R *et ál.* Hematopoietic cell transplantation using plasma and DMSO without HES, with non-programmed freezing by immersion in a methanol bath: results in 213 cases. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 511-7.
- 147 - Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R *et ál.* Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N Engl J Med* 1983; 309(22): 1347-1353.
- 148 - Philip T, Armitage JO, Spitzer G *et ál.* High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation after failure of conventional chemotherapy in adults with intermediate-grade or high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1987; 316(24): 1493-1498.
- 149 - Jagannath S, Dicke KA, Armitage JO, Cabanillas FF, Horwitz LJ, Vellekoop L, Zander AR, Spitzer G. High-dose cyclophosphamide, carmustine, and etoposide and autologous bone marrow transplantation for relapsed Hodgkin's disease. *Ann Intern Med* 1986; 104(2): 163-168.
- 150 - Gore ME, Selby PJ, Viner C *et ál.* Intensive treatment of multiple myeloma and criteria for complete remission. *Lancet* 1989; 2(8668): 879-882.
- 151 - Barlogie B, Hall R, Zander A, Dicke K, Alexanian R. High-dose melphalan with autologous bone marrow transplantation for multiple myeloma. *Blood* 1986; 67(5): 1298-1301.
- 152 - Cain JM, Collins C, Petersdorf S, Figge DC, Tamimi HK, Greer BE, Livingston RB. Phase II study of high-dose cisplatin, etoposide, and cyclophosphamide

- for refractory ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 1996 Jun; 174(6): 1688-94.
- 153 - Martín M, Casado A, I García-Carbonero *et ál.* DICEP High Dose Chemotherapy with or Without Peripheral Blood Stem Cell Support as Consolidation Treatment of Patients with Advanced Epithelial Ovarian Cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999; 18: 384.
- 154 - Peters WP, Dansey RD, Klein JL, Baynes RD. High-Dose chemotherapy and peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of breast cancer. *The Oncologist* 2000; 5: 1-13.
- 155 - Blume KG, Thomas ED. A review of autologous hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000; 6: 1-12.
- 156 - Nieto Y. Pharmacodynamics of high-dose chemotherapy. *Curr Drug Metab* 2001; 2(1): 53-66.
- 157 - Martín M, Casado A, Llorente L, López Martín JA, Rodríguez Lescure A, Nieto Y, Ayala F, Pérez-Calvo J, Pérez López C, Villegas A and Diaz-Rubio E. Quimioterapia intensiva con cuatro fármacos y trasplante autogénico de células progenitoras de sangre periférica en el cáncer diseminado de mama. *Medicina Clínica (Barc)* 1997; 109: 775-81.
- 158 - Ketterer N, Sonet A, Dumontet C *et ál.* Toxicities after peripheral blood progenitor cell transplantation for lymphoid malignancies: analysis of 300 cases in a single institution. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 1309-15.
- 159 - D'Hondt L, Wu J, André M *et ál.* Clearance kinetics of CD34+ cells from peripheral blood: an independent predictor of hematologic recovery after high-dose chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 483-9.

- 160 - Prosper F, Stroncek D, McCarthy JB, Verfaillie CM. Mobilization and homing of peripheral blood progenitors is related to reversible downregulation of $\alpha 4\beta 1$ integrin expression and function. *J Clin Invest*. 1998; 101: 2456-67.
- 161 - Roberts MM, To LB, Gillis D *et ál*. Immune reconstitution following peripheral blood stem cell transplantation, autologous bone marrow transplantation and allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1993; 12: 469-75.
- 162 - Chakraborty NG, Bilgrami S, Maness LJ *et ál*. Myeloablative chemotherapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation for metastatic breast cancer: immunologic consequences affecting clinical outcome. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 837-43.
- 163 - Ozer H, Armitage JO, Bennett CL *et ál*. 2000 Update of recommendations for the use of hematopoietic colony-stimulating factors: evidence based, clinical practice guidelines. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3558-85.
- 164 - Rapoport AP, Miler LG, Linder T *et ál*. Analysis of factors that correlate with mucositis in recipients of autologous and allogeneic stem-cell transplants. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2446-53.
- 165 - Pérez Calvo J, Brugarolas A. Treatment of acute myeloid leukemia (letter). *N Eng J Med* 1999; 340: 1436.
- 166 - Shpall E, Jones RB, Blast RC Jr *et ál*. 4-Hydroperoxy-cyclophosphamide purging of breast cancer from the mononuclear cell fraction of bone marrow in patients receiving high-dose chemotherapy and autologous marrow support: a phase I trial. *J Clin Oncol* 1991; 9: 85-93.
- 167 - Llorente L, Pérez Calvo J, Díaz Mediavilla J *et ál*. Utilidad de la cuantificación de células CD34+/CD33- para estimar la probabilidad de un injerto precoz en

- 135 autotrasplantes de CHSP. *Sangre* 1995; 40 (Supl 4): 13. Resumen 20.
- 168 - Pecora AL, Brochstein JA, Jennis A *et ál.* Total CD34+ cell content and CD34+CD33- subset predict time to neutrophil and platelet engraftment and hospital discharge in patients followin high-dose chemotherapy with primed peripheral blood progenitor cells. *Blood* 1994; 84 (Suppl. 1): 88a.
- 169 - Díaz-Mediavilla J, Llorente L, Martínez R *et ál.* Autotransplantation of peripheral blood stem cells mobilized by G-CSF in hematological malignancies: evidence for rapid and long-term sustained hematopoietic reconstitution. *Leuk Lymph* 1996; 20: 327-32.
- 170 - Bensinger W, Appelbaum F, Rowley S *et ál.* Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral blood stem cells. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2547-55.
- 171 - Tricot G, Jagannath S, Vesole D *et ál.* Peripheral blood stem cell transplants for multiple myeloma: identification of favorable variables for rapid engraftment in 225 patients. *Blood* 1995; 85: 588-96.
- 172 - Weaver CH, Hazelton B, Birch R *et ál.* An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy. *Blood* 1995; 86 (10): 3961-9.
- 173 - Lowenthal RM, Fabères C, Marit G *et ál.* Factors influencing haemopoietic recovery following chemotherapy-mobilized autologous peripheral blood progenitor cel transplantation for haematological malignancies: a retrospective analysis of a 10-year single institution experience. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 763-70.
- 174 - Pecora AL, Preti RA, Gleim GW *et ál.* CD34+CD33- Cells influence days to engraftment and transfusion requirements in autologous blood stem-cell

- recipients. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2093-104.
- 175 - Sampol Mayol A, Besalduch Vital J, Galmes Llodra A *et ál.* CD34+ cell dose and CD33- subsets: collection and engraftment kinetics in autologous peripheral blood stem cells transplantation. *Haematologica* 1998; 83(6): 489-95.
- 176 - Knudsen LM, Jensen L, Jarlbaek L *et ál.* Subsets of CD34+ hematopoietic progenitors and platelet recovery after high dose chemotherapy and peripheral blood stem cell transplantation. *Haematologica* 1999; 84: 517-24.
- 177 - Stewart Da, Guo D, Luider J *et ál.* Factors predicting engraftment of autologous blood stem cells: CD34+ subsets inferior to the total CD34+ cell dose. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 1237-43.
- 178 - Ketterer N, Salles G, Raba M *et ál.* High CD34+ cell counts decrease hematologic toxicity of autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Blood* 1998; 91: 3148-55.
- 179 - Nademanee A, Sniecinski I, Schmidt CM *et ál.* High-dose therapy followed by autologous peripheral blood stem cell transplantation for patients with Hodgkin's disease and Non-Hodgkin's lymphoma using unprimed and granulocyte colony stimulating factor mobilized peripheral blood stem cells. *J Clin Oncol* 1994; 12: 2176-86.
- 180 - Bensinger WI, Longin K, Appelbaum F *et ál.* Peripheral blood stem cells collected after recombinant granulocyte colony stimulating factor: an analysis of factors correlating with the *tempo* of engraftment after transplantation. *Br J Haematol* 1994; 87: 825-31.
- 181 - To LB, Roberts MM, Haylock DN *et ál.* Comparison of haematological recovery times and supportive care requirements of autologous recovery-

- phase peripheral blood stem cell transplants, autologous bone marrow transplants and allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9: 277-84.
- 182 - Watts MJ, Sullivan AM, Jamieson E *et ál.* Progenitor-cell mobilization after low-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor: an analysis of progenitor-cell quantity and quality and factors predicting for these parameters in 101 pretreated patients with malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 535-46.
- 183 - Guba SC, Vesole DH, Jagannath S *et ál.* Peripheral stem cell mobilization and engraftment in patients over age 60. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 1-3.
- 184 - Del Cañizo MC, López N, Vázquez L *et ál.* Hematopoietic damage prior to PBSCT and its influence on hematopoietic recovery. *Haematologica* 1999; 84: 511-6.
- 185 - Neben S, Hemman S, Montgomery M *et ál.* Hematopoietic stem cell deficit of transplanted bone marrow previously exposed to cytotoxic agents. *Exp Hematol* 1993; 21: 156-62.
- 186 - Drake M, Ranaghan L, Morris TCM *et ál.* Analysis of the effect of prior therapy on progenitor cell yield: use of a chemotherapy scoring system. *Br J Haematol* 1997; 98: 745-9.
- 187 - Gandhi MK, Jestice K, Scott MA *et ál.* The minimum CD34 threshold depends on prior chemotherapy in autologous peripheral blood stem cell recipients. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 9-13.
- 188 - Dreger P, Klöss M, Petersen B *et ál.* Autologous progenitor cell transplantation: previous exposure to stem cell-toxic drugs determines

- yield and engraftment of peripheral blood progenitor cell but not of bone marrow grafts. *Blood* 1995; 86: 3970-8.
- 189 - Amigo ML, del Cañizo MC, Caballero MD *et ál.* Factors that influence long-term hematopoietic function following autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 289-93.
- 190 - Siena S, Schiavo R, Pedrazzoli P, Carlo-Stella C. Therapeutic relevance of CD34 cell dose in blood cell transplantation for cancer therapy. *J Clin Oncol.* 2000; 18(6): 1360-77.
- 191 - Copelan EA, Ceselski SK, Ezzone SA *et ál.* Mobilization of peripheral-blood progenitor cells with high-dose etoposide and granulocyte colony-stimulating factor in patients with breast cancer, Non-Hodgkin's lymphoma, and Hodgkin's Disease. *J Clin Oncol* 1997; 15: 759-65.
- 192 - Watts MJ, Sullivan AM, Leverett D *et ál.* Back-up bone marrow is frequently ineffective in patients with poor peripheral blood stem cell mobilization. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1554-60.
- 193 - Scott MA, Ager S, Jestice HK, Mahendra P, Marcus RE. Failure to mobilise and harvest PBPC does not necessarily preclude the use of high-dose therapy and autologous stem cell rescue. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 487-8.
- 194 - Weaver CH, Potz J, Redmond J *et ál.* Engraftment and outcomes of patients receiving myeloablative therapy followed by autologous peripheral blood stem cells with a low CD34+ cell content. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19(11): 1103-10.
- 195 - Haas R, Witt B, Möhle R *et ál.* Sustained long-term hematopoiesis after myeloablative therapy with peripheral blood progenitor cell support. *Blood*

- 1995; 12: 3754-61.
- 196 - Shpall EJ, Wheeler CA, Turner SA *et ál.* A randomized phase 3 study of peripheral blood progenitor cell mobilization with stem cell factor and filgrastim in high-risk breast cancer patients. *Blood* 1999 Apr 15; 93(8): 2491-501.
- 197 - Glaspy JA, Shpall EJ, LeMaistre CF *et ál.* Peripheral blood progenitor cell mobilization using stem cell factor in combination with filgrastim in breast cancer patients. *Blood* 1997 Oct 15; 90(8): 2939-51.
- 198 - Stiff PJ. Management strategies for the hard-to-mobilize patient. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23 Suppl 2: S29-33.
- 199 - Haas R, Möhle R, Frühauf S *et ál.* Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. *Blood* 1994; 83: 3787-94.
- 200 - Leibundgut K, von Rohr A, Brühlhart K *et ál.* The number of circulating CD34+ blood cells predicts the colony-forming capacity of leukapheresis products in children. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15:25-31.
- 201 - Zimmerman TM, Lee WJ, Bender JG, Mick R, Williams SF. Quantitative CD34 analysis may be used to guide peripheral blood stem cell harvests. *Bone Marrow Transplant* 1995; 9: 439-44.
- 202 - Osma M, Ortuno F, de Arriba F, Heras I, Moraleda JM, Garcia VV. Preleukapheresis peripheral blood CD34+ cells predict progenitor cell collection yield and the necessary number of procedures to undergo. *Haematologica* 1999; 84(3): 280-1.
- 203 - Sautois B, Fraipont V, Baudoux E, *et ál.* Peripheral blood progenitor cell collections in cancer patients: analysis of factors affecting the yields.

- Haematologica 1999; 84(4): 342-9.
- 204 - Yu J, Leisenring W, Bensinger WI, Holmberg LA, Rowley SD. The predictive value of white cell or CD34+ cell count in the peripheral blood for timing apheresis and maximizing yield. *Transfusion* 1999; 39(5): 442-50.
- 205 - Goldschmidt H, Hegenbart U, Wallmeier M, Hohaus S, Haas R. Factors influencing collection of peripheral blood progenitor cells following high-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 1997; 98: 736-44.
- 206 - Weaver CH, Birch R, Greco FA, *et ál.* Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells: randomized evaluations of different doses of filgrastim. *Br J Haematol* 1998; 100(2): 338-47.
- 207 - Pérez-Calvo J, Fernández-Hidalgo O, García-Foncillas J *et al.* Effect of a single course of standard-dose BCNU on mobilization kinetics in chemotherapy-untreated patients with glioma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000; 19: 64a.
- 208 - Husson B, Ravoet C, Dehon M *et ál.* Predictive value of the steady-state peripheral blood progenitor cell counts for the yield of PBPC collected by leukapheresis after mobilization by granulocyte colony stimulating factor alone or chemotherapy and G-CSF. *Blood* 1996; 87: 3526-8.
- 209 - Fruehauf S, Haas R, Conrath C *et ál.* Peripheral blood progenitor cell counts during steady-state hematopoiesis allow to estimate the yield of mobilized PBPC after filgrastim-supported cytotoxic chemotherapy. *Blood* 1995; 85: 2619-26.
- 210 - Hollingsworth KL, Zimmerman TM, Karrison T, Oliver A, Williams SF. The CD34+ Cell Concentration in Peripheral Blood Predicts CD34+ Cell Yield in

the Leukapheresis Product. *Cytotherapy* 1999; 2: 141-6.