

*Parámetros reticulocitarios como predictores de
prendimiento mieloide en pacientes sometidos a
trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos*

José Ramón Molina Hurtado

TITULO: *Parámetros reticulocitarios como predictores de prendimiento mieloide en pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos*

AUTOR: *JOSE RAMON MOLINA HURTADO*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2010
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

ISBN-13: 978-84-7801-331-9
D.L.: CO-197-2010



ÍNDICE

A.- INTRODUCCIÓN.....	7
A.1.- HISTORIA DEL TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA.....	9
A.2.- FISIOLÓGÍA DEL PRENDIMIENTO.....	14
A.3.1.- Asentamiento (“homing”).....	14
A.3.2.- Microambiente medular.....	18
A.3.3.- Migración y alojamiento (“lodgment”).....	18
A.3.4.- La stem cell dentro de la médula ósea: el nicho.....	20
A.3.5.- Regeneración de la hematopoyesis.....	22
A.3.6.- Regeneración de la serie roja.....	23
A.3.- FACTORES CLÍNICOS QUE INFLUYEN EN EL PRENDIMIENTO:	
FALLO DEL INJERTO.....	27
A.4.- PREDICTORES DEL PRENDIMIENTO.....	31
A.5.- PARÁMETROS RETICULOCITARIOS COMO PREDICTORES DEL PRENDIMIENTO.....	33
B.- JUSTIFICACIÓN.....	43
B.1.- EL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS EN LA ACTUALIDAD.....	45
B.2.- UTILIDAD DE LOS PARÁMETROS RETICULOCITARIOS.....	48
C.- OBJETIVOS.....	51
C.1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	53
C.2.- OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	53

D.- PACIENTES Y MÉTODOS.....	55
D.1.- GENERALIDADES DE LOS PACIENTES.....	57
D.2.- PACIENTES PEDIÁTRICOS.....	62
D.3.- INFECCIONES.....	65
D.4.- OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	65
D.5.- ANÁLISIS RETICULOCITARIO.....	66
D.6.- TIPO DE ESTUDIO.....	69
D.7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	69
F.- RESULTADOS.....	71
F.1.- CINÉTICA DE LOS PARÁMETROS DE MADURACIÓN RETICULOCTARIA Y PRENDIMIENTO MIELOIDE TRAS EL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.....	73
F.2.- ANÁLISIS DE FACTORES CLÍNICOS QUE INFLUYEN EN EL PRENDIMIENTO ERITROIDE.....	91
F.2.1.- Análisis univariante.....	91
E.2.2.- Análisis multivariante.....	101
F.3.- CINÉTICA DE LA FRACCIÓN RETICULOCITARIA INMADURA (IRF) SEGÚN LA FUENTE DE PROGENITORES.....	103
F.4.- ANTELACIÓN EN BASE A LOS PARÁMETROS DE MADURACIÓN RETICULOCITARIA DEL PRENDIMIENTO MIELOIDE.....	105

**F.5.- PARÁMETROS DE MADURACIÓN RETICULOCITARIOS EN PACIENTES
CON FALLO DEL INJERTO.....111**

G.-DISCUSIÓN.....117

H.- CONCLUSIONES.....129

I.- BIBLIOGRAFÍA.....133

A decorative graphic element consisting of a vertical gray bar on the left and a horizontal gray bar extending to the right from the bottom of the vertical bar. The word "INTRODUCCIÓN" is centered in the horizontal bar.

INTRODUCCIÓN

El trasplante de médula ósea, es preferible llamarlo en la actualidad de progenitores hematopoyéticos, no es más que un nuevo tratamiento, complejo y fascinante, que tiene como fin lograr la curación definitiva de determinadas patologías hematológicas. Este procedimiento posee, no obstante, una historia detrás que nunca debe ser del todo olvidada, y menos por un historiador, por lo que aquí, brevemente, quedan reflejados los hechos más importantes en el desarrollo y perfeccionamiento de esta novedosa terapia, que en las últimas décadas tantas vidas ha salvado.

A.1.- HISTORIA DEL TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA

Varios siglos antes del nacimiento de Jesús de Nazaret, en la Grecia Clásica ya existían conocimientos de supuestas patologías hematológicas, con descripciones de esplenomegalias, adenopatías y anemias, que en los siglos siguientes fueron adoptadas por otras civilizaciones posteriores, aunque pobremente desarrolladas. Alfred Velpeau en 1927, publicó el caso de una florista de 63 años que presentaba fiebre, debilidad, cálculos urinarios y abdomen con crecimiento descomunal. En la autopsia encontró un hígado y un bazo enormes y “la sangre era como una papilla de avena que recordaba la consistencia y el color de las levaduras del vino tinto”¹, datos muy sugestivos de una Leucemia Mieloide Crónica, a pesar de lo cual, siempre se ha considerado la primera descripción de una Leucemia Aguda. Estas y otras enfermedades hematológicas, descritas posteriormente, como el Mieloma Múltiple^{2,3}, la Aplasia Medular⁴ o el Síndrome Mielodisplásico^{5,6}, tienen en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos una solución terapéutica.

A finales del siglo XIX, concretamente en 1891, Brown-Sequard y D'Arsonval plantearon la posibilidad de reconstituir la producción de células sanguíneas en casos de anemia con la administración de bazo, crudo o cocido, de animales en los pacientes, o bien, mediante la administración de médula por vía oral a pacientes, también diagnosticados de anemia o con debilidad por Tuberculosis^{7,8}.

Sin embargo la verdadera historia del trasplante de médula ósea (Alo-TMO) se inicia en el año 1939 cuando Osgood infunde, sin éxito, varios mililitros de médula ósea en pacientes con aplasia medular por tratamiento con sales de oro, procedente de su hermano⁹, siendo en los años venideros con los estudios de los efectos de las radiaciones durante la Segunda Guerra Mundial, cuando se abrió realmente el camino a este nuevo procedimiento.

Diez años después del intento de Osgood, Jacobson descubre que resguardando el bazo, se protegía de la muerte a los ratones que eran sometidos a irradiación letal¹⁰. Lorenz en 1951 realiza trasplantes alogénicos en animales utilizando irradiación total¹¹. Barnes y Loutit propusieron en 1954 la existencia de un efecto inmune antitumoral (Injerto contra Leucemia) asociado a lo que denominaron "*wasting syndrome*" que posteriormente se llamó Enfermedad del Injerto Contra el Huésped (EICH), siendo los primeros en describirlo¹², mientras que Billingham once años después fue quien estableció los requisitos para el desarrollo de la EICH¹³.

A finales de la década de los 50, ED. Thomas realizó en Estados Unidos los primeros trasplantes alogénicos de médula ósea en humanos¹⁴, como él mismo refiere, durante los años siguientes se utilizaron con el objetivo de curar a pacientes con Leucemias Agudas. G. Mathé realiza, en 1958, en cinco víctimas del accidente de un reactor atómico trasplantes de médula ósea, presentando cuatro de ellos quimerismo transitorio sin EICH¹⁵.

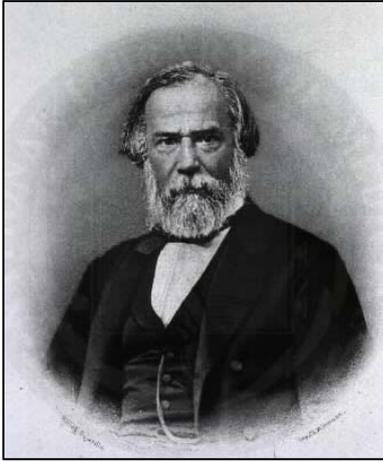
Con el paso de los años y ante el éxito que experimentaba el procedimiento se utilizó como tratamiento de otras patologías hematológicas con el objetivo final de alcanzar la curación. Al término de esta década y comienzos de la siguiente se estudian, primero en animales y posteriormente en humanos, nuevas técnicas para mejorar los logros del procedimiento y aumentar la supervivencia de los pacientes, como el uso del metotrexate para la profilaxis de la EICH¹⁶, la realización de Iso-TMO¹⁷ o la utilización de la irradiación corporal total en el acondicionamiento¹⁸.

Pero un aspecto clave en el desarrollo de esta terapia fue el descubrimiento, por Jean Dausset en 1958, del primer antígeno leucocitario humano (HLA)¹⁹, siendo de gran importancia sus posteriores aportaciones, conjuntamente con otros autores, sobre el estudio del sistema de histocompatibilidad humana²⁰.

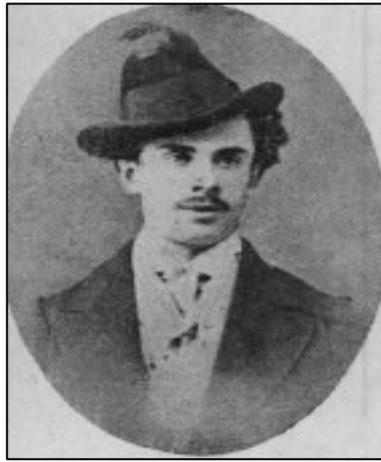
Mathé, en 1963 realiza el primer Alo-TMO con quimera estable y larga supervivencia²¹. Ya en 1968 Gatti realiza en Minnesota el primer trasplante alogénico HLA-idéntico, con médula ósea procedente de un hermano, consiguiendo reconstitución inmunológica en un paciente con inmunodeficiencia combinada severa²². George W. Santos, en 1969, realiza el primer Alo-TMO utilizando ciclofosfamida en el acondicionamiento²³ y O'Reilly en 1972 realiza en New York el primer Alo-TMO a partir de un donante no emparentado en un paciente con inmunodeficiencia congénita²⁴. Thomas a finales de los años 70 realiza trasplantes alogénicos en pacientes afectados de leucemia pero en primera remisión completa, con el objetivo de mejorar la supervivencia²⁵. En 1983, de nuevo Santos, crea un nuevo protocolo de acondicionamiento sin utilizar radioterapia, mediante la combinación de dos agentes quimioterápicos: busulfan y ciclofosfamida²⁶.

En 1989, A.Kessinger realiza el primer trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (Alo-TPH) obteniendo los mismos de sangre periférica mediante

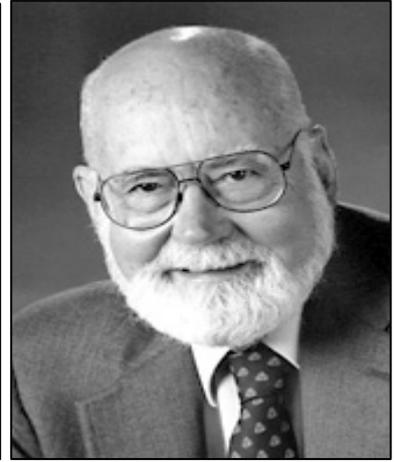
un procedimiento de aféresis²⁷, dichos progenitores, ya habían sido descubiertas en la circulación periférica por Maximov en 1904²⁸. Ese mismo año de 1989, E. Gluckman, realiza el primer Alo-TPH con progenitores hematopoyéticos obtenidos de sangre procedente de cordón umbilical²⁹ en un paciente de 6 años de edad, diagnosticado de Anemia de Fanconi, que recibió los progenitores de la sangre del cordón de su hermana. Por último en 1997, S.Giralt y S.Slavin, de forma independiente, realizan los primeros Alo-TPH con acondicionamiento de intensidad reducida^{30,31}, no olvidando a Rainer Storb, el gran impulsor de este nuevo tipo de trasplante de progenitores hematopoyéticos³².



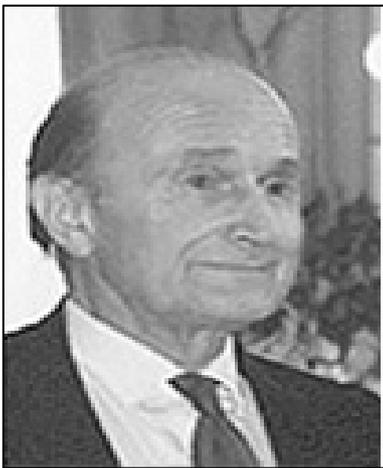
CE. Brown-Sequard



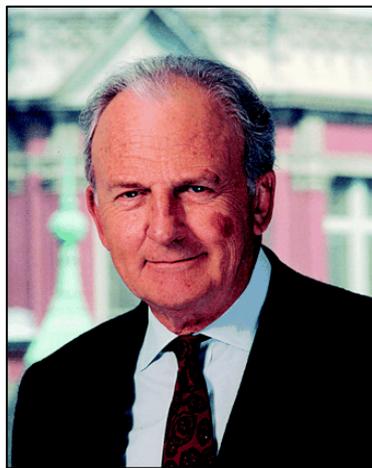
JA. D'Arsonval



ED. Thomas



G. Mathé



GW. Santos



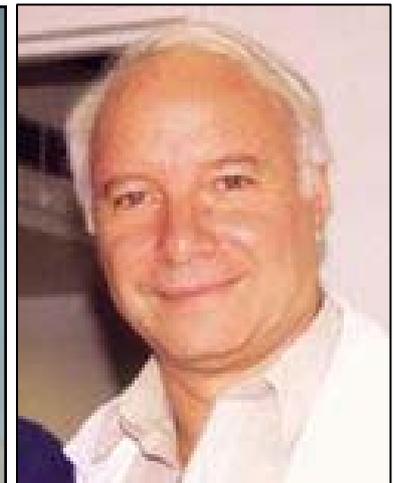
A. Kessinger



E. Gluckman



S. Giralt



S. Slavin

A.3.- FISIOLÓGÍA DEL PRENDIMIENTO

Una vez que ha finalizado el acondicionamiento y se han infundido los progenitores hematopoyéticos (“*stem cells*”) comienza un periodo de tiempo variable, caracterizado por la presencia de pancitopenia, que finaliza una vez que se produce el prendimiento del injerto del donante, el cual es verificado cuando se alcanza, en sangre periférica, una cifra de neutrófilos superior a 500/ μ l.

Sin embargo, con antelación se produce la aparición en sangre periférica de precursores de los hematíes; son los reticulocitos, corpúsculos celulares que en su proceso madurativo, ya han perdido el núcleo y que ocupan el penúltimo escalón en la hematopoyesis de la serie roja. Durante la eritropoyesis, estos reticulocitos son liberados desde las trabéculas óseas al torrente circulatorio sanguíneo mediante un proceso de citodiábasis, perdiendo posteriormente, y de forma progresiva, el ARN que contienen en su interior al tiempo que reducen su volumen corpuscular, transformándose, de esta forma, en hematíes.

El prendimiento de la stem cell, tras la infusión, es el resultado final de un complejo proceso, aun no estudiado de forma definitiva, en el que tras una circulación periférica transitoria, secundaria a la infusión, las stem cells adquieren el status de células residentes dentro de la médula ósea³³, aunque tan sólo un pequeño porcentaje de las células referidas acaban permaneciendo allí de forma estable³⁴. Durante este proceso se reclutan stem cells de la circulación periférica a través de los capilares (microcirculación) de la médula ósea, a la que sigue una migración transendotelial hasta los cordones hematopoyéticos extramedulares de la misma, a este proceso se le denomina asentamiento (“*homing*”). Seguidamente se produce la migración de las stem cells dentro de la médula hasta llegar a los lugares anatómicos adecuados, que darán lugar a la formación de los nichos hematopoyéticos de stem cells³⁵, en un proceso conocido como alojamiento (“*lodgment*”). Una vez en los nichos las stem cells deben mantener la capacidad de diferenciación y proliferación, procesos que están regulados por un complejo

sistema de interacciones en el que intervienen células, factores de crecimiento y moléculas de adhesión, así como otras estructuras proteicas de la matriz extracelular³⁶. El prendimiento, por tanto, es el inicio de la proliferación y diferenciación para producir células hematopoyéticas funcionales y maduras a partir de las stem cells del donante que han ocupado con éxito el nicho hematopoyético.

A.3.1.- ASENTAMIENTO DE LOS PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS (“HOMING”) EN LA MÉDULA ÓSEA

Definido por Quesenberry y Becker en 1998³⁷ aunque descrito por vez primera por Tavolini ocho años antes³⁸, es el proceso por el que se reclutan, por parte de la médula ósea, stem cells procedentes de la circulación periférica, tras haber sido infundidas por vía intravenosa – si bien algunos autores han reportado buenos resultados por vía intraósea³⁹-, objetivándose asimismo la mínima captación que realiza el bazo⁴⁰⁻⁴¹, aunque otros órganos como el hígado o el pulmón también las reclutan, siendo, de esta forma, células que se pierden para la hematopoyesis⁴², pero que en ocasiones inyectadas localmente o por vía sistémica, pueden favorecer la regeneración tisular⁴³.

En este proceso es básico, en primer lugar, la interacción de las stem cells, a través de las moléculas de adhesión expresadas en su superficie, con las células de la pared endotelial de los microvasos de la médula^{38,39,44} y la posterior migración transendotelial a los espacios hematopoyéticos extravasculares⁴⁵. En el asentamiento intervienen, por tanto, moléculas de adhesión de los progenitores hematopoyéticos (CAMs) como son las integrinas, moléculas con dominios transmembrana con subunidades α y β , citokinas y factores quimiotácticos. Asimismo, el receptor de la sialomucina (expresado en la stem cells) para P-selectina y el P-selectina glicoprotein ligando 1(PSGL-1) expresado también en la superficie de este tipo celular⁴⁶⁻⁴⁷ juegan un papel crucial en este proceso de

asentamiento. Estos ligandos de las selectinas deben ser α 1-3 fucosilados para formar terminales glicanos como el sialyl Lexis x (xLex)⁴⁸.

Por otro lado, en la superficie de las células endoteliales medulares, se expresan E-selectina, que tiene un efecto sinérgico con VLA-4 (very late antigen-4)⁴⁹, P-selectina y la citokina flt3-ligando (Fl), clave en la adhesión de los progenitores al endotelio vascular⁵⁰. Fl, el ligando para flt3, es expresado por las células endoteliales, mientras que flt3 es expresado únicamente por células CD34+, perdiéndose rápidamente una vez que se inicia la diferenciación. Fl además activa las b1 integrinas que intervienen en la adhesión.

Una vez que la stem cell está amarrada a la pared del endotelio, interviene el factor derivado del estroma-1 (SDF-1), que induce un conjunto de señales en cascada intracelular, que lleva a la activación de las integrinas⁵¹ que, particularmente VLA-4, se une a su receptor endotelial, concretamente a la molécula de adhesión a la pared vascular (VCAM-1), produciendo una adhesión más firme^{52,53}. VLA-4, y también VLA-5 son expresados, por tanto, por la stem cell, por lo que la aparición de anticuerpos contra estos antígenos dificulta el proceso de asentamiento, algo que sucede también si son contra VCAM-1⁵⁴.

SDF-1 es una quimioquina expresada por las células del estroma medular y las células endoteliales. El tratamiento de células CD34+ con SDF-1 aumenta la expresión de integrinas, VLA-4, VLA-5 y LFA-1 y aumenta la adhesión de dichas células al endotelio medular⁵⁵. Asimismo, el proceso de migración de las CD34+ a través de su unión al SDF-1 favorece la repoblación medular^{56,57}. En las células señaladas, tras la quimio-radioterapia se produce un aumento de la expresión de SDF-1, que cuando interacciona con su receptor CXCR-4, expresado en las stem cells, conduce definitivamente el asentamiento en la médula^{58,59}. Por tanto, este último paso es definitivo en el prendimiento del injerto, y el eje SDF-1/CXCR4 el principal regulador del proceso.

Tras la infusión de progenitores hematopoyéticos, mediante técnicas de fluorescencia se ha comprobado la existencia de una alta tasa inicial de asentamiento, seguida por un paulatino descenso en el número de stem cells en la médula en los siguientes tres días⁶⁰. Además, las interacciones de adhesión, se establecen rápidamente, por lo que procesos inflamatorios podrían intervenir en dicho mecanismo o la utilización de anestésicos que interviene en el flujo sanguíneo lo que permite variaciones en el movimiento e interacción de las stem cells⁶¹.

Con un nuevo método en el que se marcan las stem cells con una proteína de fluorescencia verde, se ha visto en ratones que el prendimiento se produce principalmente en las epífisis del fémur y en los huesos planos cortos como las vértebras y las costillas⁶².

Sin embargo, de todas la stem cells que inician el proceso de asentamiento, sólo la mitad al tercer día de la infusión consiguen realmente adherirse al estroma, el resto muere por apoptosis, antes de que se inicien otros procesos de eliminación celular, tipo inmunológico, Por tanto, la adhesión al estroma es fundamental para preservar su viabilidad⁶³.

A.3.2.- MICROAMBIENTE MEDULAR

En la médula ósea existe un tejido con capacidad para sustentar la hematopoyesis. Aunque en circunstancias normales la mayoría de las stem cells residen en la médula ósea, una parte nada desdeñable de las mismas pueden estar en la circulación periférica, migrando rápidamente a través de la misma, y jugando un papel decisivo en el prendimiento en la médula no ablatida⁶⁴, ya que dentro de la misma, estos progenitores, estrechan relaciones con el estroma medular⁶⁵.

El estroma medular es un complejo tejido formado por diversos tipos de células entre las que destacan las reticulares, adipocitos, osteoblastos (con capacidad de secretar G-CSF) ⁶⁶, células endoteliales vasculares, células musculares lisas de las paredes de los vasos y macrófagos. Este sistema tisular es complementado con los productos que sintetiza, incluyendo los componentes de la matriz extracelular entre los que se incluyen la fibronectina, colágeno tipo I, III y IV, laminina, trombospondina, vitronectina, hemonectina, ácido hialurónico y diversos proteoglicanos. Muchos de estos compuestos se expresan en distintas localizaciones dentro de la médula ósea⁶⁷. Además, los factores hemopoyéticos de crecimiento, sintetizados a nivel medular y extramedular, también juegan un papel decisivo en la proliferación y diferenciación de los progenitores.

Por lo tanto, son tres los principales componentes del microambiente medular; las células, las estructuras de la matriz extracelular y los factores de crecimiento hematopoyético, siendo todos ellos necesarios para que la stem cell desarrolle correctamente sus funciones.

A.3.3.- MIGRACION Y ALOJAMIENTO (“LODGMET”) DE LA STEM CELL DENTRO DE LA MÉDULA.

Inmediatamente tras un trasplante de progenitores hematopoyéticos, y aunque la mayoría de las células que llegan a la médula ósea lo hacen a través de los vasos centrales de la misma, la posterior redistribución dentro de los espacios extravasculares no se produce de forma aleatoria sino en concordancia con su fenotipo. Las stem cells murinas migran mayoritariamente hacia la región endosteal, mientras que las células diferenciadas de línea se redistribuyen desde dicha región hasta regiones centrales de la médula⁶⁸. El examen histológico de la médula permite observar que la hematopoyesis está restringida a los compartimentos extravasculares, una simple capa de células endoteliales que forman una serie de sinusoides venosos ramificados que surgen de los capilares a lo largo de la superficie endosteal del hueso⁶⁹. La aparente organización

aleatoria de las células dentro de los espacios extravasculares medulares se pierde al observar distintas asociaciones celulares como los eritroblastos y los macrófagos, los megacariocitos con las células vasculares endoteliales o entre los progenitores mieloides, los linfocitos B y fibroblastos del estroma. Estas asociaciones parecen indicar la presencia de moléculas de adhesión claves para que se produzcan.

Sin embargo las moléculas que intervienen en este proceso de migración y redistribución a los espacios extravasculares de la médula han sido poco estudiadas por el momento, cabe destacar, no obstante, el papel que desempeña la primera molécula que fue identificada y que tenía un impacto significativo en el alojamiento medular, el ácido hialurónico (AH), sintetizado por la stem cell⁷⁰, así como otras descubiertas posteriormente como la osteopontina (Opn), básica en la migración y el alojamiento⁷¹ y la isoforma transmembrana del factor stem cell (tmSCF), esta última molécula es básica para el alojamiento medular de la stem cell⁷².

A.3.4.- LA STEM CELL DENTRO DE LA MÉDULA ÓSEA: EL NICHOS.

En los últimos años se han puesto de relieve una serie de moléculas y tipos de células que juegan un papel decisivo en la regulación de la stem cells dentro del nicho hematopoyético. Schofield³⁵ formuló la hipótesis del nicho sugiriendo que la stem cell es en realidad una célula dependiente de un tejido, por lo que para su existencia y subsistencia es necesaria la presencia de otros tipos celulares. En este microambiente celular, físicamente nicho, cuya localización es la región endosteal de la médula, la stem cell puede autorrenovarse, mientras que la diferenciación y proliferación son inicialmente inhibidas en este lugar.

Pero una vez ya asentada en el nicho, la stem cell, si tiene la capacidad necesaria para proliferar y diferenciarse, lo que es favorecido por un complejo sistema en el que intervienen células, factores de crecimiento, moléculas de

adhesión y otro tipo de estructuras como las proteínas de la matriz extracelular. Se ha demostrado que la trombospondina puede actuar en solitario como molécula de adhesión de la stem cell o conjuntamente con el ligando c-kit formando parte de un complejo mecanismo de señales que intervienen en la regulación in vitro de la stem cell⁷³, así como también el ácido hialurónico, secretado por la stem cell, que cuando in vitro, se bloquea mediante un receptor, se inhibe la proliferación de la stem cell y la diferenciación granulocítica⁷⁰.

Otras moléculas como VLA-4 y VLA-5 controlan la proliferación y diferenciación, tanto directa como indirectamente, a través de señales inducidas por citocinas, cuando existen anticuerpos contra VLA-4 se observa una pérdida de la capacidad de repoblación medular. La expresión y funcionabilidad de VLA-4 y VLA-5 está regulada por el ligando flt-3, que juega un papel fundamental en la supervivencia y estimulación del crecimiento de las stem cell modificando las adhesiones de dicha célula⁵⁰.

También es bien conocida la importancia de la interacción entre la stem cell y los osteoblastos en la región endosteal para la regulación de la proliferación celular, demostrándose cómo los osteoblastos influenciaban la funcionabilidad de la stem cell explícitamente, produciendo la proteína Jagged 1 y a través de la activación de Notch⁷⁴, observándose también, en otro estudio que la existencia de una ablación de osteoblastos acarrea una disminución de la hematopoyesis⁷⁵, además, evidencias in vitro demuestran que los osteoblastos expanden el número de stem cells⁷⁶, favoreciendo, en definitiva, el prendimiento tras un trasplante hematopoyético⁷⁷.

Zhang identificó la proteína morfogenética ósea (BMP) como reguladora de la stem cell. Esto ocurre específicamente a través de la activación de un tipo de célula íntimamente ligada a la stem cell, mediante el receptor IA de la BMP, estas células son los osteoblastos en forma de huso N-caderina+CD45+ (SNO)⁷⁸. El aumento en la médula de estas SNO se correlaciona con un aumento del número de stem cells.

Recientemente, se ha demostrado que la migración y alojamiento de las stem cells dentro de la región endosteal de la médula está relacionado con la vía del receptor sensible al calcio (CaR), que se expresa de forma intensa en la superficie de las stem cells, respondiendo a las altas concentraciones de calcio en el nicho endosteal⁷⁹.

El proto-oncogen bmi-1 juega un papel importante en la regulación de la stem cell. La expresión de Bmi-1 es clave en la conservación de esta célula, observándose en ratones que la no expresión de dicho proto-oncogén, se correlaciona con un déficit de repoblación medular de la stem cell, además de alteraciones de expresión en genes de las mismas incluyendo p16 Ink4a y p19Arf. La alteración de estos dos genes en una célula hematopoyética normal conlleva a una inhibición de la proliferación y a una muerte programada dependiente de p53, respectivamente⁸⁰.

La vía Wnt es también básica en la regulación de la stem cell⁸¹, inhibidores de la misma dan lugar a que se produzca una inhibición en el desarrollo de la stem cell. Por otro lado, la activación de dicha vía induce un aumento en la expresión de HoxB4 y Notch1, genes con un papel crítico en la regulación de la stem cell como ya se ha descrito anteriormente^{82,83}. Las proteínas de la vía Wnt no han sido aún purificadas satisfactoriamente, lo que demuestra la importancia de los lípidos en las señales de la stem cell, en relación a esta vía⁸⁴.

Existen otros mecanismos, que se van conociendo con el tiempo, que influyen en el prendimiento de la stem cell, como son la expresión de receptores de prostaglandina E2 en estas células, que favorecen el asentamiento, la supervivencia celular y una posterior capacidad de proliferación, que sustenta la repoblación a largo plazo de la médula ósea⁸⁵. Recientemente, se ha demostrado que el prendimiento está, asimismo, relacionado con la dependencia que existe en relación a la subunidad alfa de la guanine-nucleotide-binding protein⁸⁶.

En definitiva, el prendimiento de la stem cell tras un trasplante de progenitores hematopoyéticos es un proceso dinámico, complejo y que se produce en diferentes etapas. Hoy, se conocen circunstancias básicas para que se produzca satisfactoriamente, y se sabe que la cooperación entre diversas citocinas, moléculas de adhesión y componentes físicos de la médula ósea, junto con la correcta funcionabilidad de determinadas células del microambiente medular, son necesarios para asegurar el éxito del prendimiento, pero continúa habiendo lagunas reseñables, áreas importantes, que todavía persisten sin explorar. Quizás en un futuro no muy lejano, la utilización de microarrays, tanto en el análisis de la stem cell como en las células del microambiente, y el estudio en humanos del prendimiento in vivo, sean las herramientas necesarias para completar este complejo puzzle.

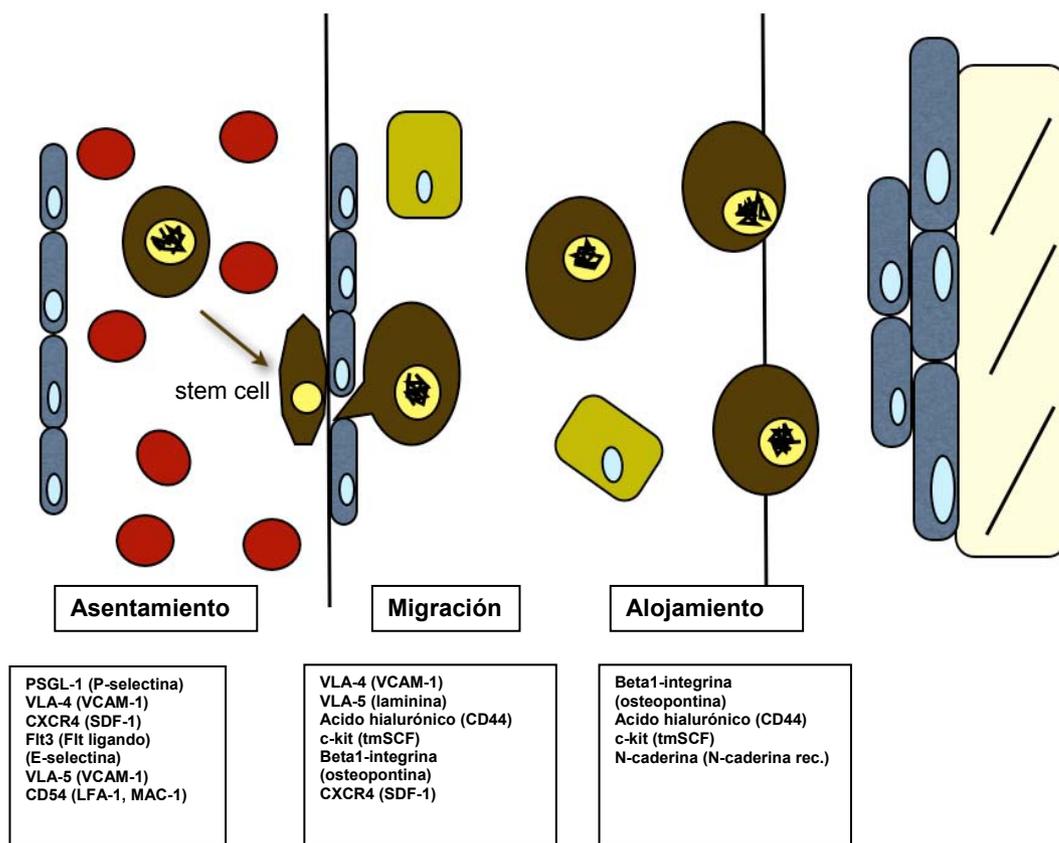


Figura 1: Principales factores implicados en el prendimiento hematopoyético tras un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos y en las distintas fases en las que intervienen.

A.3.5.- REGENERACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS.

La velocidad y calidad de la regeneración hematopoyética es variable y generalmente depende, entre otras variables, de la enfermedad de base, el régimen de acondicionamiento utilizado o el tipo de fuente de extracción de los progenitores. Normalmente, la reconstitución es más rápida en un acondicionamiento no ablativo comparado con uno ablativo, en los segundos, el periodo de pancitopenia es mayor, siendo el prendimiento anterior si los progenitores proceden de sangre periférica que si lo hacen de médula ósea⁸⁷. Asimismo, la edad y situación física del paciente juega un papel importante. Los pacientes jóvenes y con buen performance presentan un prendimiento anterior a aquellos de mayor edad y estado avanzado de su patología^{88,89}.

La capacidad regenerativa en el post trasplante parece, en muchos casos, no estar relacionada con la relación de parentesco, la compatibilidad HLA o la profilaxis de enfermedad injerto contra huesped⁹⁰. El factor más importante en el mismo es la cantidad de células CD34+ infundidas⁹¹, ya que éstas no solo son importantes por su capacidad hematopoyética sino por su potencial transformación en células endoteliales^{92,93}.

Por otro lado, la presencia, en los primeros 100 días tras el Alo-TPH, de un porcentaje mayor o menor de quimera mixta depende de diversas variables, como el tipo de acondicionamiento, la profilaxis de EICH, la aparición de EICH o la compatibilidad HLA donante-receptor⁹⁴. Además, la presencia de un quimerismo mixto se asocia a una mayor probabilidad de recaída de la patología de base por la que el paciente fue sometido a este procedimiento^{95,96,97}.

A.3.6.- REGENERACIÓN DE LA SERIE ROJA.

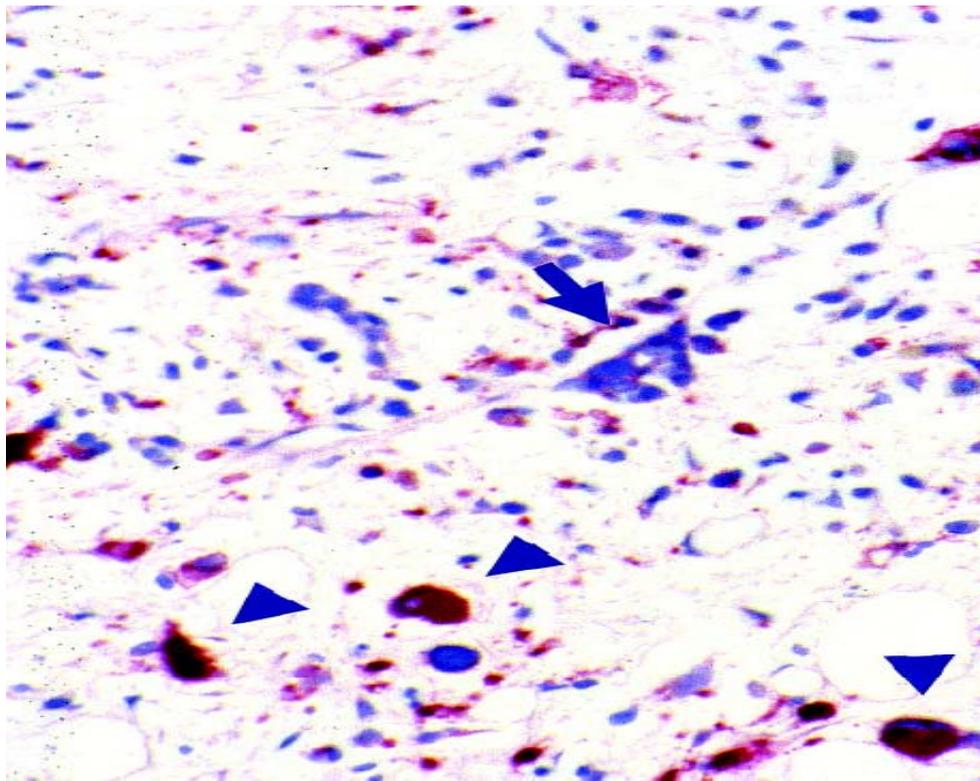
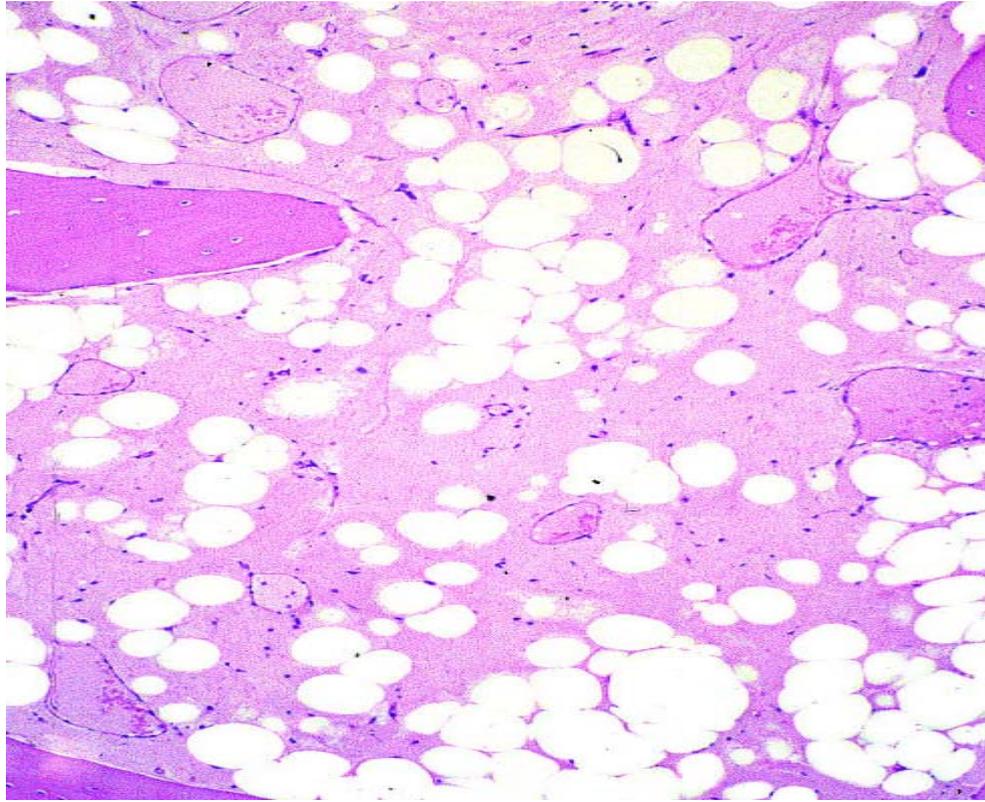
La angiogénesis es uno de los factores más importantes para la restitución hematopoyética, la supervivencia de un número considerable de células

endoteliales del huésped tras el acondicionamiento ablativo sugiere la persistencia de una vascularización del estroma medular, proceso en el que están implicados los hemangioblastos con su capacidad de transformación en células endoteliales, al tiempo que las CD34+ infundidas, actuarán como precursores de células hematopoyéticas y endoteliales, que facilitarán el asentamiento⁹⁸.

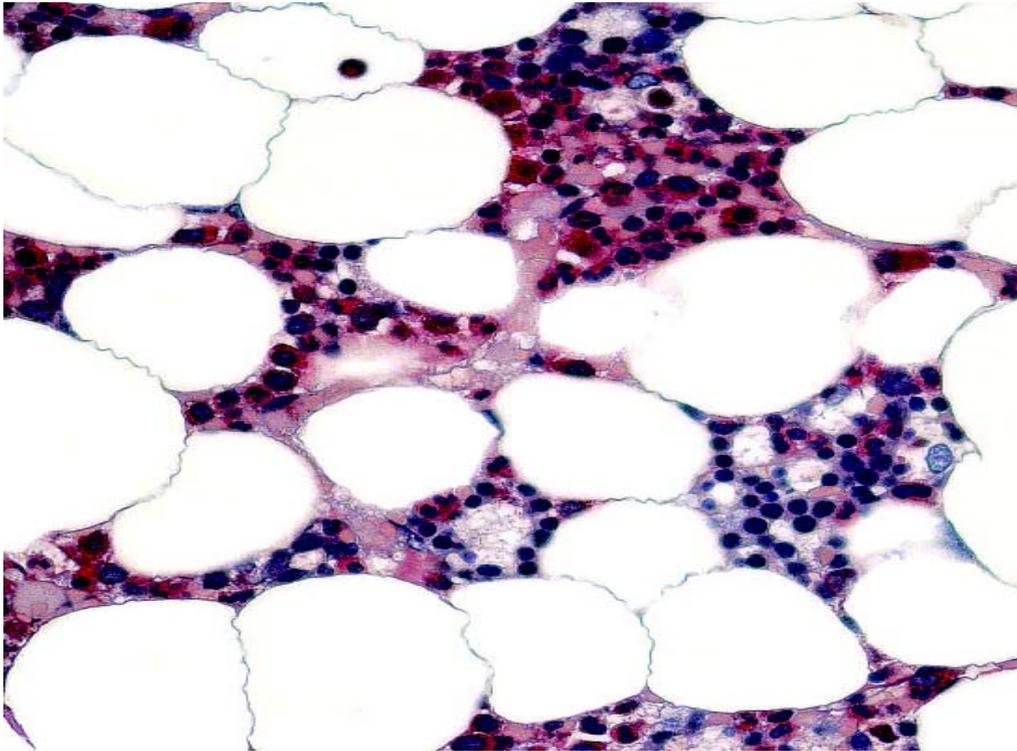
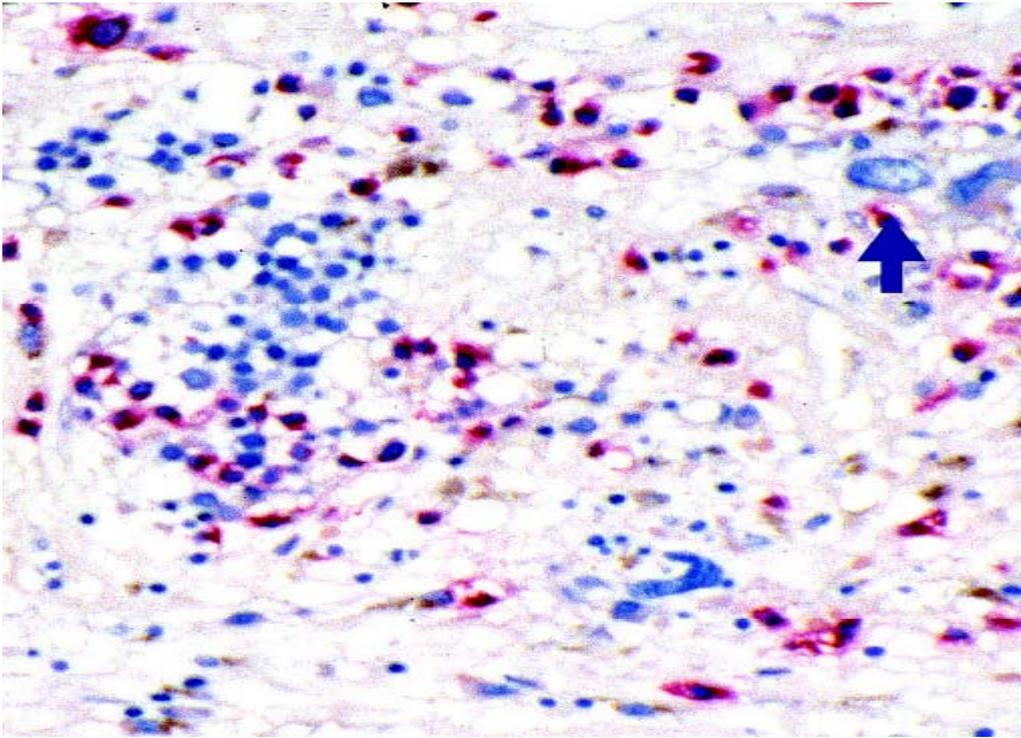
Al final de la primera semana post trasplante, aparecen islas de precursores eritroides con macrófagos centrales, rodeado todo de un entramado edematizado y graso⁹⁹. Existiendo relación entre el número de macrófagos existentes y el de precursores eritroides, conteniendo estas islas restos celulares e hierro abundante¹⁰⁰, los macrófagos, por tanto, constituyen una parte importante del microambiente medular, jugando un papel definitorio en la regulación y diferenciación de los progenitores¹⁰¹, aunque su principal función es favorecer la formación de esas islas de eritroblastos y la posterior generación de hematíes maduros¹⁰². Al principio, los precursores de la serie roja muestran cambios megaloblásticos y datos de alteraciones nucleares que retrasan la maduración, debido al efecto que el acondicionamiento origina en el ADN¹⁰⁰.

Inmediatamente después de la aparición de estas islas de progenitores eritroides, comienzan a aparecer datos que indican la presencia de regeneración de la megacariopoyesis¹⁰³. Sin embargo, hay que esperar algunos días hasta la aparición de las primeras colonias mieloides, generalmente a nivel de las trabéculas óseas¹⁰⁴, observándose ya a partir de la tercera semana la aparición de colonias eritroides y mieloides en proporciones normales.

Como consecuencia de este desarrollo, la serie roja es la primera en aparecer en sangre periférica tras un Ato-TPH, viéndose, además, favorecido este hecho por un proceso de citodiábasis, que facilita la salida, a través de la microcirculación de la médula ósea, de progenitores eritroides en sus últimos estadios de maduración.



Figuras 2 y 3: Biopsia de médula ósea en los días +5 y +7 post-Alo-TPH. (De von Marion AMW. Histopathology 2006)



Figuras 4 y 5: Biopsia de médula ósea en los días +14 y +21 post-Alo-TPH. (De von Marion AMW. Histopathology 2006)

A.3.- FACTORES CLÍNICOS QUE INFLUYEN EN EL PRENDIMIENTO-FALLO DEL INJERTO.

Tras el acondicionamiento y posterior periodo de pancitopenia, debe producirse el prendimiento hematopoyético, que ha sido definido de diversas formas en la literatura científica, como, por ejemplo, la presencia de un número específico de células del donante caracterizadas por la hematopoyesis mieloide o linfoide, determinadas por nuevas técnicas, como el quimerismo estudiado por citogenética o biología molecular, capaces de demostrar el origen de esta celularidad¹⁰⁵. Sin embargo, a efectos prácticos el prendimiento es verificado cuando se alcanzan cifras de neutrófilos en sangre periférica superiores a 500/ μ l, mantenidos o no durante tres días consecutivos. Son diversos los factores, que desde el punto de vista clínico, influyen en mayor o menor grado en el prendimiento del injerto hematopoyético, pudiendo retrasar la consecución del mismo o, en un porcentaje de pacientes nada desdeñable, impedir que se produzca, dando lugar a una situación clínica conocida como fallo del injerto o del implante. Éste, a su vez, puede ser de dos tipos: primario o secundario.

El primario se define como la presencia de unas cifras de neutrófilos inferiores a 200/ μ l en el día +28 con ausencia de indicios de recuperación hematológica tras el acondicionamiento (estudio de quimerismo, aspirado de médula ósea...), mientras que el secundario se establece como el descenso mantenido en los recuentos periféricos de neutrófilos a menos de 200/ μ l tras haberse producido una recuperación, transitoria, de dicha cifra, es decir más de 500/ μ l neutrófilos durante al menos tres días consecutivos¹⁰⁶. En términos globales, el fallo del injerto se produce, aproximadamente, en el 5% de los pacientes que son sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (Alo-TPH)^{107,108,109}.

Woolfrey habla de un proceso en el que intervienen determinados factores relacionados con la respuesta inmune de los leucocitos del receptor en base a su poder de activación, disparidades antigénicas HLA, así como la capacidad de las células del injerto de evitar la inmunidad residual del huesped¹¹⁰. En líneas generales, son bien conocidos diversos factores de riesgo que pueden favorecer la aparición del mismo, sin embargo con el paso de los años y las consiguientes mejoras en la práctica del trasplante, ha ido disminuyendo el porcentaje de pacientes que sufren fallo del implante. El grupo de Seattle revisó 333 pacientes con anemia aplásica trasplantados entre 1970-1976; se produjo fallo del injerto (primario o secundario) en el 35% de los pacientes en contraposición al 9% ocurrido entre el periodo 1982-1996¹¹¹. Uno de estos factores, el número de progenitores infundidos, es crucial para conseguir el prendimiento, como ha sido bien demostrado en pacientes trasplantados por anemia aplásica, observándose que a mayor número de progenitores infundidos más probabilidad de alcanzar el prendimiento¹¹². Esto, además, se puede observar también, en pacientes que reciben los progenitores procedentes de sangre de cordón umbilical, lo que indica una cifra escasa de progenitores infundidos, presentando, estos pacientes, mayor porcentaje de fallos del injerto^{113,114}.

Los pacientes con aplasia debido a la inmunodepresión mediada por el acondicionamiento y el propio desorden inmunológico que presentan, tiene una tasa mayor de fallo del implante¹¹⁵. Además, esta complicación post-trasplante también se presenta en pacientes sometidos a este proceso por otras patologías de base, como leucemia mieloide crónica, talasemia o anemia de células falciformes, que no presentan inmunosupresión crónica por quimioterapia previa, además de las transfusiones recibidas, que pueden conllevar una aloinmunización previa a los antígenos de histocompatibilidad del donante. Ambos datos aumentan, en ellos, el riesgo de fallo del injerto^{116,117}. Lo mismo ocurre en pacientes con inmunodepresión previa por inmunodeficiencias congénitas¹¹⁸.

El fallo del injerto es más frecuente, asimismo, si existe disparidad HLA entre el donante y el receptor^{119,120}, tras depleción T^{121,122} o con la utilización de

regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida^{123,124}. Respecto a la incompatibilidad HLA, si esta es de clase II no influye en el implante¹²⁵, pero se favorece el fallo del mismo si la incompatibilidad es de clase I (HLA-C)¹²⁶.

La incompatibilidad donante-receptor en el grupo sanguíneo ABO es otra variable a destacar, siendo mayor la tasa de fallo del injerto cuando existe incompatibilidad mayor ABO comparado con los Alo-TPH con incompatibilidad menor o compatibilidad ABO¹²⁷.

Otros factores que influyen en el rechazo del injerto es la presencia de células NK residuales en el receptor¹²⁸, el daño que pueda presentar el microambiente medular, clave para la interacción natural entre las células que componen dicho microambiente y los progenitores hematopoyéticos, como en pacientes con aplasia o aquellos que han recibido tratamientos muy agresivos y prolongados de quimioterapia¹²⁹, así como esos otros que presentan infecciones como CMV, VHH-6 o VHH-8 que entre otras acciones pueden originar daño en el estroma medular^{130,131}.

La inmunosupresión post-trasplante ha disminuido las tasas de fallo del injerto pero determinados fármacos como el ganciclovir, cotrimoxazol, metotrexate, metamizol... que son mielotóxicos pueden favorecerlo, con más frecuencia el de tipo secundario¹³². Algunos pacientes, especialmente aquellos con disparidad HLA o incompatibilidad ABO, pueden presentar periodos transitorios de disfunción dentro de un prendimiento débil, generalmente asociado a la EICH¹³³.

Por lo tanto, para evitar el fallo del injerto es conveniente disminuir, en la medida de lo posible, las transfusiones de hemoderivados previos, aumentar la capacidad inmunosupresora del acondicionamiento, conseguir un injerto con la mayor compatibilidad HLA, utilizar factores de crecimiento celular, infundir un

número adecuado de progenitores hematopoyéticos, reducir la utilización de fármacos mielotóxicos y evitar la aparición de infecciones víricas.

En este sentido, son diversos los factores que pueden favorecer la presencia de fallo del injerto, una grave complicación que pone en riesgo la vida del paciente y ante la que es necesario tomar medidas a la mayor brevedad posible. Una vez conocida la presencia del fallo del injerto, la medida terapéutica más eficaz y que ofrece mayores posibilidades de supervivencia al paciente a largo plazo es la reinfusión de progenitores, bien de procedencia autóloga o alogénica, aunque en base al estudio del quimerismo existente en el paciente y la manipulación ex-vivo de los progenitores, las posibilidades terapéuticas se diversifican pudiendo emplearse factores de crecimiento o aumentando el tratamiento inmunosupresor. De especial interés es la utilización de estas últimas medidas cuando no existe la posibilidad de reinfusión.

Por lo tanto, y en relación a lo expuesto, una vez sospechada la presencia del fallo del injerto, debemos actuar de varias formas. La primera es aumentando las dosis de factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) administradas durante el trasplante¹³⁴ o la utilización de eritropoyetina (EPO)¹³⁵, y aunque ninguna de las dos ha demostrado claramente su eficacia, pueden obtenerse resultados satisfactorios, según la quimera existente en ese momento. Otra medida es aumentar la inmunosupresión, aunque, sin duda, la mejor solución a esta complicación vital, y una vez ya establecido el diagnóstico, es una segunda infusión de progenitores hematopoyéticos, bien de procedencia autóloga o alogénica, a ser posible con un elevado número de progenitores¹³⁶ y evitando la depleción de linfocitos T¹³⁷. No está del todo claro, pero parece que la mejor fuente de progenitores es la sangre periférica tras la utilización de G-CSF para su movilización, de donde es más fácil obtener un mayor número de los mismos¹³⁸. Las series publicadas de pacientes que reciben una segunda infusión por fallo del injerto son esperanzadoras, arrojando buenos resultados en cuanto a la supervivencia global^{139,140}.

Por último, ante un fallo del injerto debemos realizarnos siempre una serie de cuestiones:

- 1.- ¿Se infundieron un número adecuado de progenitores hematopoyéticos (CD34+)?
- 2.- ¿Había recibido el receptor previamente muchas transfusiones o había estado expuesto a células del donante?
- 3.- ¿Existía disparidad HLA donante-receptor, acondicionamiento de intensidad reducida o depleción de linfocitos T?
- 4.- ¿Existía incompatibilidad mayor ABO entre el donante y el receptor?
- 5.- ¿Existía algún obstáculo para el prendimiento como la existencia de una esplenomegalia masiva?
- 6.- ¿Existió prendimiento inicial?
- 7.- ¿Se realizó una adecuada profilaxis de la EICH?
- 8.- ¿Existió fallo secundario? ¿Cuánto tiempo después del prendimiento?
- 9.- ¿Hubo una infección concomitante como CMV, VHS-6, VHS-8 o Parvovirus B19?
- 10.- ¿Hay evidencia de inmunidad residual en el receptor (Linfocitos T o NK) contra las células del donante?
- 11.- ¿Está el donante disponible para obtener de él nuevos progenitores o existe algún donante alternativo?

Y una última cuestión de importancia que tratamos de contestar mediante este estudio, ¿podemos conocer con algunos días de antelación la existencia de este fallo del injerto?

A.4.- PREDICTORES DEL PRENDIMIENTO

Desde que el trasplante de progenitores hematopoyéticos se ha sistematizado internacionalmente, se han estudiado determinados parámetros, con el objetivo de adelantar en el tiempo el prendimiento medular, entendido éste como la presencia de unas cifras de neutrófilos, en sangre periférica, superiores a 500/ μ l. Los más estudiados son los parámetros de maduración reticulocitaria, pero no han sido los únicos:

En 1993, Baoiocchi G et al, describieron, en 10 pacientes sometidas a Auto-TPH por cáncer de ovario, que el aumento del G-CSF endógeno y la IL-8 precedían en siete días al prendimiento granulocítico¹⁴¹.

Dubovsky J et al, en 1999, estudiaron la cinética del quimerismo precoz en 58 pacientes pediátricos sometidos a Alo-TPH, observando que un aumento en el quimerismo a expensas de células procedentes del donante, precedía en siete días al prendimiento hematopoyético¹⁴².

Raanani P et al, en 2001, estudiaron en 60 pacientes, 56 sometidos a auto-TPH y 4 Alo-TPH, la relación entre los niveles de fosfato en sangre y el recuento de neutrófilos, observando que el nadir de fosfato precedía en 2 días el prendimiento neutrofilico. Observaron también que los niveles máximos de IL-6 e IL-8 coincidían en el tiempo con el nadir de los niveles de fosfato¹⁴³.

Akpek G et al estudiaron, en 2003, en 23 pacientes sometidos a Auto-TPH por patologías hematológicas u otros tipos de tumores y en consolidaciones de LMA, la presencia de neutrófilos en la mucosa oral como predictores de recuperación neutrofilica, además, según sus resultados los recuentos de neutrófilos en la mucosa oral precedían el timing de los eventos clínicos

asociados a la neutropenia -inicio y finalización de episodios febriles- con mayor exactitud que los recuentos periféricos de neutrófilos¹⁴⁴.

A.5.- PARÁMETROS RETICULOCITARIOS COMO PREDICTORES DEL PRENDIMIENTO

Dentro de aquellos parámetros que pueden ser utilizados en la rutina clínica diaria, los más estudiados, como predictores de prendimiento, son los de maduración reticulocitaria. Como ya se ha definido, la serie roja es la primera, tras el Alo-TPH, que se objetiva en la médula ósea, y también, la primera en aparecer en sangre periférica porque, además, las células más maduras de esta serie, en condiciones fisiológicas, tienen capacidad para atravesar los sinusoides de la médula y abandonarla mediante un proceso de citodiábasis, apareciendo de esta forma en la circulación sistémica, siendo asimismo las que presentan un mayor periodo de supervivencia. Sin embargo, muchos de los trabajos reseñados, no presentan una sistemática prospectiva, tienen un n escaso y están realizados en Auto-TPH.

Weinberg RS et al publicaron en 1986 un caso de un paciente con talasemia mayor que recibió un injerto de su hermana afecta de B-talasemia menor. Para valorar el prendimiento, estudiaron diversos parámetros como la Hb F y el antígeno i, las CFU-E y BFU-E, y los reticulocitos, con el afán de valorar la correcta reconstitución eritropoyética¹⁴⁵.

Emminger W et al, en 1989, estudiaron en 27 niños sometidos a 31 Auto-TPH el tiempo que tardaba en alcanzar el prendimiento en base a la cantidad de células nucleadas y UFC-GM infundidas, con independencia de su origen. Estudiaron también los reticulocitos absolutos y vieron que existía una relación inversa con la aparición de los reticulocitos tras la infusión. Cuanto más progenitores se infundían más rápidamente aparecían los reticulocitos en sangre periférica¹⁴⁶.

Davies BH et al, en 1989, utilizaron el tiazol de naranja para la cuantificación por citometría de flujo de los reticulocitos¹⁴⁷. Ese mismo año, el mismo equipo, mediante esta técnica, estudio en 20 pacientes sometidos a Auto-TPH por leucemia mieloblástica aguda el índice de fluorescencia media (MFI) como predictor de prendimiento mieloide. En 12 de los 20 pacientes estudiados, el MFI precedía a la recuperación neutrofílica. De esta forma, se iniciaron los estudios de los parámetros de maduración reticulocitaria como predictores de prendimiento mieloide y marcadores de actividad eritropoyética tras un TPH¹⁴⁸.

Van den Berg H et al, en 1990, estudiaron en 19 pacientes pediátricos sometidos a Alo-TPH la correlación existente ente el tipo de prendimiento y el estudio de la médula mediante biopsia ósea, realizada entre los días +14 y +20 desde la infusión. Encontraron que la celularidad medular se relacionaba con la presencia de células de la serie roja en circulación periférica, lo que achacaban a la vida media más larga que presentaba este tipo de línea celular en relación al resto de la serie mieloide y linfoide, cuya vida media es más corta aún, en estas circunstancias, que en condiciones normales¹⁴⁹.

Van Hove L et al, en 1990, estudiaron la metodología para la estandarización de los parámetros de maduración reticulocitaria, mediante el uso de citometría de flujo y el tiazol de naranja como fluorocromo que se unía al ARN reticulocitario¹⁵⁰.

Schimenti K et al, en 1992, compararon inicialmente en 289 muestras y posteriormente en otras 407, procedentes de pacientes sometidos a TPH, los resultados obtenidos mediante el recuento manual en frotis de sangre periférica teñidos con azul de metileno y los aportados por el citómetro utilizando el tiazol de naranja como fluorocromo, observando una mayor sensibilidad mediante este último sistema al detectar mejor los reticulocitos maduros¹⁵¹.

Lazarus HM et al, en 1992, publicaron en una serie en 23 pacientes sometidos consecutivamente a TPH (tanto Auto como Alo) los resultados de

cinética de la eritropoyesis tras la mieloablación del acondicionamiento, observando que en 10 de estos pacientes el aumento de reticulocitos en sangre periférica, medidos por citometría de flujo, eran capaces de predecir en varios días el prendimiento mieloide, además, en 8 de estos 10 pacientes la recuperación de la eritropoyesis se determinaba anteriormente utilizando la citometría que con el contaje manual en extensiones de sangre periférica¹⁵².

Davies SV et al. en 1992 estudió en una serie de 22 pacientes sometidos a Auto-TPH y 14 a Alo-TPH, el número total de reticulocitos y los reticulocitos de alta fluorescencia (RETH) en números absolutos, como indicadores de prendimiento mieloide. Los RETH alcanzaron niveles de 0 subiendo posteriormente hasta alcanzar los puntos de corte establecidos observando que aquellos que no los alcanzaban presentaban un prendimiento inadecuado. El presentar una EICH aguda disminuía los recuentos recitulocitarios¹⁵³.

Sakairi K et al, en 1992, publicó una serie de 8 pacientes sometidos a Alo-TPH, estudiando dos parámetros de maduración reticulocitaria, el MFI>15 y el RETH>5%, usando como analizador el Sysmex R-1000. El MFI y el RETH alcanzaban los puntos de corte establecidos en los días 13.1 y 13.5, respectivamente, mientras que los neutrófilos alcanzaban los 500/ μ l en el día +17.1¹⁵⁴. (en japones)

Greinix HT et al, en 1994, estudiaron en 27 Alo-TPH y 21 Auto-TPH el prendimiento en base a dos parámetros, los reticulocitos de alta fluorescencia, pero no en porcentaje si no en números absolutos (RETH) y los neutrófilos. La aparición de RETH precede a la aparición de los neutrófilos en 7 y 2 días en Alo-TPH y Auto-TPH respectivamente, aumentando este periodo de tiempo en los Alo-TPH si se utilizaba EPO pero igualándose si al mismo tiempo se utilizaba G-CSF¹⁵⁵.

En un estudio multicéntrico español, en 1994, se estudiaron mediante el analizador Sysmex R-2000 a 58 pacientes sometidos a Auto-TPH, 28 a Alo-TPH y 28 que recibieron ciclos de inducción-consolidación por Leucemia Aguda. El

IRF>10% fue el primer signo de prendimiento hematopoyético y precedía en cada grupo referido en 9, 3 y 2 días, respectivamente, el prendimiento mieloide (neutrófilos>500/ μ l). Es el primer trabajo en el que aparece un nuevo parámetro de maduración reticulocitario, la fracción reticulocitaria inmadura (IRF), como indicador precoz de prendimiento mieloide¹⁵⁶.

En 1995 Vannuchi AM et al estudiaron en 18 pacientes sometidos a Alo-TPH la aparición en sangre periférica de UFC-E como predictoras del prendimiento eritroide pero sin relacionarlo con el prendimiento granulocítico mieloide, determinando su presencia en sangre periférica en el día +14¹⁵⁷.

Un año después, Dalal BI et al estudiaron en 37 pacientes sometidos tanto a alo-TPH como Auto-TPH el RMI (reticulocyte Maturity index) comparado con otros datos de prendimiento, como el número de leucocitos totales, neutrófilos absolutos, reticulocitos absolutos y plaquetas. El RMI precedía con dos días de antelación el prendimiento neutrofílico, aunque cuanto más se retrasaba el prendimiento mayor eran los días con los que precedía el RMI la posterior subida de neutrófilos¹⁵⁸.

D'Onofrio G et al, en 1996, estudiaron en 31 pacientes, sometidos a Alo-TPH y 12 a Auto-TPH, hasta 12 variables para detectar aquellas que mejor precedían el prendimiento hematopoyético. El RETH>5% fue el indicador más precoz y con mayor sensibilidad de prendimiento hematopoyético en el 79,1% de los casos. La mediana del RETH ocurre en el día +13 y la de los neutrófilos >500/ μ L en el día +18, alcanzando significación estadística¹⁵⁹.

Testa U et al, en 1997, analizaron en 36 pacientes sometidos a Auto-TPH (5 por leucemia aguda, 10 por linfoma y 21 por cáncer de ovario) un parámetro reticulocitario, el RETH, entre otros marcadores como son la hemoglobina, eritropoyetina..., como indicadores de prendimiento eritroide¹⁶⁰.

Sica S et al, en 1998, compararon en 13 pacientes sometidos a Auto-TPH obtenidos de sangre periférica, en los que el injerto eran células CD34+ seleccionadas, respecto a una cohorte histórica de pacientes sometidos a Auto-TPH que recibieron un injerto obtenido de sangre periférica no fraccionado, si un parámetro reticulocitario -los reticulocitos de alta fluorescencia (RETH>5%)- eran predictores de prendimiento granulocítico, observando que adelantaba en varios días, concretamente 4, el prendimiento en aquellos que recibieron el injerto no fraccionado, no ocurriendo lo mismo en aquellos que recibieron un injerto con selección de células CD34+, que lo adelantaba en 1 sólo día¹⁶¹.

Grotto HZW et al, en 1999, estudiaron en 10 pacientes sometidos a Alo-TPH un nuevo parámetro: el "IRF dubling time" mediante un analizador llamado Cell-Dyn 3500 Abbot. Este parámetro se definía como el día en que el IRF doblaba el nadir de dicho parámetro. Observó, en esta corta serie, que este parámetro adelantaba entre 6 y 12 días el prendimiento mieloide¹⁶².

En 1999 Lacombe F et al, estudiaron en 300 muestras procedentes de distintos pacientes diversos parámetros reticulocitarios, especialmente el IRF, mediante distintos sistemas de análisis, demostrando la precisión y validez del ABX Pentra 120 Retic. Además, estudió la forma de manejo de la muestra y la rapidez con la que debía ser analizada así como la temperatura y tiempo de conservación¹⁶³.

En el año 2000 George P et al, estudiaron en 25 pacientes sometidos a Auto-TPH por linfoma el RETH, aunque estableciendo como punto de corte el 2%, como indicador precoz de prendimiento mieloide, observando que precedía en 3 días al mismo¹⁶⁴.

Kageoka T, en 2001, estudió mediante el Sysmex R-300, en una serie de pacientes sometidos a Alo-TPH, el IRF>10% como indicador de prendimiento hematopoyético, mostrándose este parámetro como predictor de prendimiento mieloide¹⁶⁵. (artículo en japonés, no pone el número de pacientes)

Torres A. et al, estudiaron, en 2001, cuatro parámetros de maduración reticulocitaria (IRF>10%, RETH>3%, MFI>10 y VRM>110 fl) mediante el analizador ABX Pentra 120 Retic en una serie de 60 pacientes, 30 de ellos sometidos a Alo-TPH y los 30 restantes a Auto-TPH. Es el primer trabajo en el que se utiliza el volumen reticulocitario medio (VRM) como indicador de prendimiento. Todos alcanzaban significación a la hora de predecir en varios días el prendimiento mieloide (neutrófilos>500/ μ l), y el RETH la alcanzaba también respecto a neutrófilos>100/ μ l¹⁶⁶.

Dubner D et al estudiaron, en 2002, el stress oxidativo mediante la lipoperoxidasa plasmática como indicadores de prendimiento mieloide junto con el estudio de un parámetros de maduración reticulocitaria (MFI>10) en 27 pacientes sometidos a Alo-TPH, llegando a la conclusión de que éste último era el más precoz, con una mediana en el día +17, mientras que neutrófilos >500/ μ l que alcanzaba la mediana en el día +21. Sin embargo el aumento entre los días +12 y +14 de los niveles de lipoperoxidasa plasmática, en lugar de descender, predecían una evolución desfavorable del paciente¹⁶⁷.

En el año 2003, Noronha JF et al, estudiaron en 26 pacientes sometidos a Alo-TPH y otros 21 sometidos a Auto-TPH, mediante el analizados ABX Pentra 120 Retic, diversos parámetros reticulocitarios, concretamente el nº absoluto de reticulocitos, el MFI y el ratio VRM/VCM, siendo estos dos últimos parámetros los que indicaban con más precocidad el prendimiento mieloide en ambos grupos ¹⁶⁸.

Yildirim I et al, en 2004, estudiaron diversos antígenos eritrocitarios junto con contajes en sangre periférica de reticulocitos, en números absolutos y porcentaje (>1%) por citometría en 31 pacientes sometidos a Alo-TPH como predictores de prendimiento, siendo los antígenos eritrocitarios Rh y Sistema Kidd¹⁶⁹.

Grazziutti M et al, analizaron en 2006 de forma prospectiva a 90 pacientes sometidos a 165 Auto-TPH, y de manera retrospectiva otras dos series de

pacientes, la primera de ellas estaba compuesta por 117 individuos diagnosticados de mieloma múltiple, sometidos a Auto-TPH y la segunda constaba de 99 pacientes sometidos a Auto-TPH por patología no mielomatosa. En estas series, estudiaron un parámetro de maduración reticulocitaria como predictor de prendimiento mieloide, pero definiendo éste como la presencia de neutrófilos en sangre periférica superiores a 100/ μ l. Este parámetro, descrito por Grotto, es el "IRF doubling time": es decir, el día en que los valores de IRF doblan a los del nadir de dicho parámetro. Adelantaban al prendimiento en unos 4-5 días. Además, demostraron que las transfusiones sanguíneas realizadas durante el procedimiento no afectaban a las mediciones reticulocitarias¹⁷⁰.

En el año 2007, ya publicamos una parte de este trabajo, concretamente 136 pacientes sometidos a Alo-TPH, y observamos que tres de los parámetros reticulocitarios estudiados, RETH, IRF y MFI, predecían como mínimo en cuatro días el prendimiento mieloide. En el análisis univariante realizado el número de células CD34+ infundidas y la compatibilidad ABO influían en el prendimiento, no manteniendo la significación en el análisis multivariante¹⁷¹.

A continuación resumimos en esta tabla algunos de los trabajos más destacados.

<i>Autor (Año)</i>	<i>n</i>	<i>Tipo TPH</i>	<i>Parámetro reticulocitario</i>	<i>Días antelación</i>
Weinberg RS. (1986)	1	Alo	Nº absoluto	
Emminger W. (1989)	31	Auto	Nº absoluto	
Saikiri K. (1992)	8	Alo	MFI (15%), RETH (5%)	4
Davies SV. (1992)	36	Auto+Alo	RETH	
Lazarus HM. (1992)	23	Auto+Alo		
Greinix HT. (1994)	48	Auto+ Alo	RETH (absoluto)	7 y 2
Mult. Español (1994)	86	Auto+Alo	IRF	9 y 3
D´Onofrio G. (1995)	43	Auto+Alo	RETH, Nº absoluto	6 y 5
Dalal BI. (1996)	37	Auto+Alo	IRF	2
Testa U. (1997)	36	Auto	RETH	
Sica S. (1998)	13	Auto	RETH (5%)	4
Grotto HZW. (1999)	10	Alo	IRF dt	6-12
George P. (2000)	25	Auto	RETH (2%)	3
Torres A. (2001)	60	Auto+Alo	RETH, IRF, MFI, VRM	4
Dubner D. (2002)	27	Alo	IRF	4
Norhonda JF. (2003)	47	Auto+Alo	Nº abs, MFI, VRM/VCM	6 y 3
Yildirim I. (2004)	31	Alo	Nº absolutos y % (>1%)	-2
Grazziuti M. (2006)	282+99	Auto	IRF dt	4 y 5
Molina JR. (2007)	136	Alo	RETH, IRF, MFI, VRM	4

Tabla 1: Principales publicaciones, en las que se estudian distintos parámetros reticulocitarios y su relación con el prendimiento mieloide tras un trasplante de progenitores hematopoyéticos.

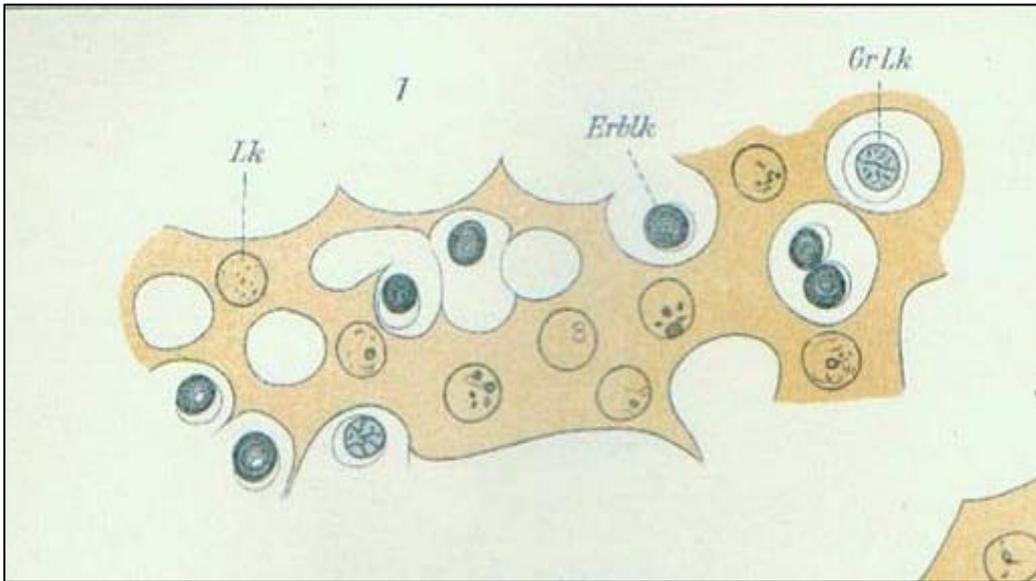


Figura 6: Primera representación gráfica de la médula ósea. Neumann (1868).

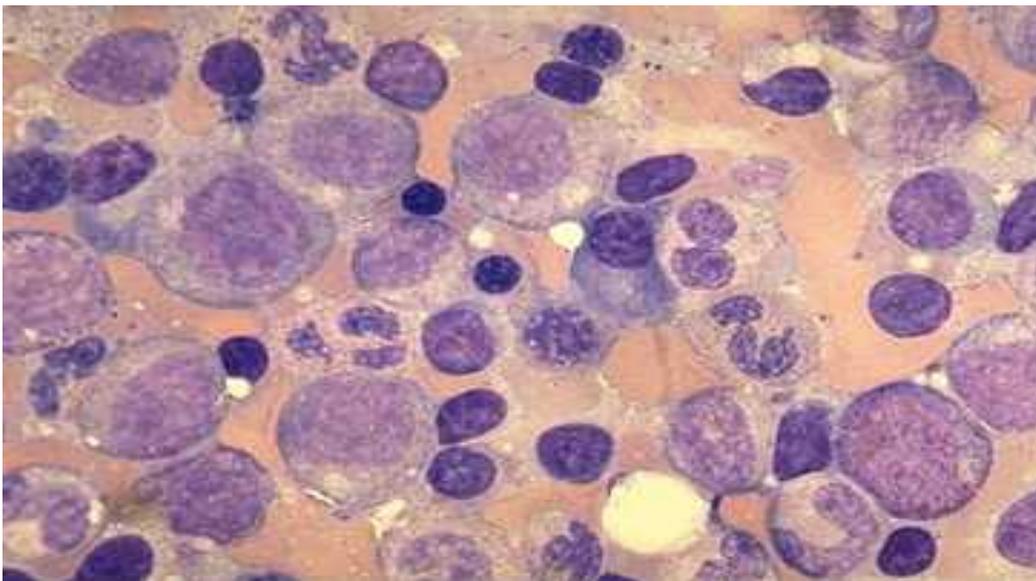


Figura 7: Médula ósea normal.



JUSTIFICACIÓN

B.1- EL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS EN LA ACTUALIDAD

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (Alo-TPH) se ha convertido en la actualidad, en el único tratamiento curativo para una serie de pacientes que presentan determinadas patologías hematológicas, de estirpe neoplásica o no. Este agresivo procedimiento consiste, fundamentalmente, en la sustitución de la hematopoyesis del paciente, por ser ésta neoplásica, insuficiente o defectuosa, por otra de un donante compatible. En un intento por favorecer el acceso a dicha terapia de un número cada vez más amplio de pacientes, tratando de evitar que esto suponga incrementar la morbi-mortalidad que intrínsecamente acarrea el proceso, se han producido modificaciones logísticas y clínicas en el trasplante convencional.

Una de ellas es la disminución en la intensidad ablativa del acondicionamiento -trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida (Alo-TPH-AIR)- lo que ha dado lugar a que aumente la edad máxima para ser sometido a este complejo procedimiento o la realización del mismo en paciente con importante comorbilidad. Otros cambios destacables han sido la aceptación de donantes no emparentados y con incompatibilidades HLA respecto al receptor y la utilización, cada vez mas frecuente, de nuevas fuentes de las que obtener los progenitores hematopoyéticos necesarios para la realización de este fascinante procedimiento.

Una de estas fuentes son los progenitores hematopoyéticos obtenidos de sangre periférica mediante un proceso de aféresis, siendo A. Kessinger la primera en utilizarla, aunque con depleción de linfocitos T en un Alo-TPH en un paciente de 18 años, diagnosticado de leucemia linfoblástica aguda, produciéndose satisfactoriamente el prendimiento, aunque finalmente falleció en el día +32²⁷. Otra de las fuentes de progenitores es la sangre de cordón umbilical, utilizada por

primera vez para un Alo-TPH por E. Gluckman en 1989, en una paciente con Anemia de Fanconi²⁹. Su utilización ha permitido que pacientes que no presentan un hermano HLA-idéntico ni donantes compatibles en los registros internacionales puedan ser trasplantados, no obstante la celularidad de la que consta el injerto es baja, por lo que de ello se derivan diversas consecuencias como el presentar una mayor tasa de fallo del injerto que las otras fuentes utilizadas y un prendimiento más tardío, con las complicaciones que un periodo tan prolongado de pancitopenia extrema acarrearán.

Por otra parte, durante el periodo de neutropenia, los pacientes presentan una mayor susceptibilidad para presentar determinados tipos de infecciones que pongan en peligro su vida, siendo esta la principal causa de mortalidad en dichos pacientes durante el proceso¹⁷², por lo que la aparición de signos que nos indiquen la presencia de la recuperación de neutrófilos pueden ser de gran utilidad en el manejo clínico de estos pacientes. En este sentido, durante los últimos años se han estudiado varios parámetros biológicos con la intención de predecir la recuperación de las cifras periféricas de neutrófilos.

Sin embargo, desde hace años, se sabe que la primera serie que da indicios del prendimiento hematopoyético derivado del donante es la serie roja, pudiendo ésta ser estudiada en sangre periférica mediante el análisis de los parámetros de maduración reticulocitarios.

La introducción en la medicina de la citometría de flujo ha permitido tener un método fiable que nos permita determinar con precisión los recuentos reticulocitarios, supliendo al contaje de los mismos a través de la microscopía óptica, técnica que ha sido utilizada durante años. Además, la citometría de flujo nos permite obtener parámetros de maduración reticulocitarios basados en la cantidad de ARN-m que presentan los reticulocitos así como en el volumen de los mismos. Una vez que el eritroblasto acidófilo pierde el núcleo en su proceso de maduración se transforma en reticulocito, corpúsculo celular con gran cantidad de

ARN-m en su citoplasma que progresivamente va desapareciendo, conforme se va produciendo la síntesis de hemoglobina y enzimas básicas para el normal funcionamiento del hematíe, al mismo tiempo que reducen su tamaño. Los reticulocitos más inmaduros son los primeros corpúsculos celulares que aparecen en sangre periférica derivados de la restauración de la hematopoyesis procedente del donante.

Nosotros y otros grupos, como ya hemos referido, hemos estudiado previamente estos parámetros reticulocitarios a la hora de predecir el prendimiento neutrofílico tras la realización de un Alo-TPH. Los parámetros reticulocitarios testados han sido, reticulocitos de alta fluorescencia (RETH), la suma de reticulocitos de alta y media fluorescencia conocida como fracción de reticulocitos inmaduros (IRF), el índice de fluorescencia media (MFI) y el volumen reticulocitario medio (VRM). Tres de estos cuatro parámetros han demostrado ya su validez a la hora de predecir en varios días la inminente recuperación de neutrófilos.

Otros parámetros estudiados, por otros grupos, han sido el día en que se dobla el nadir del IRF o la ratio MRV/MCV que pueden predecir hasta en seis días el prendimiento mieloide. Sin embargo, ninguno de estos parámetros ha sido validados prospectivamente en una serie elevada de pacientes sometidos a Alo-TPH y en los estudios publicados el punto de corte varía de unos trabajos a otros, no habiendo sido bien establecido, hasta el momento, uno definitivo, ni una metodología para hacerlo.

En una serie previa, realizada antes de este estudio, de 60 pacientes, 30 sometidos a Alo-TPH y 30 a Auto-TPH, sistematizamos la dinámica de trabajo, definimos los puntos de corte para cada parámetro observando la validez de los mismos. Sin embargo los pacientes sometidos a trasplante autólogo –que son la mayoría en las series publicadas- presentan un tiempo de neutropenia menor que los alogénicos y tanto las complicaciones infecciosas como la posibilidad de que

se produzca un fallo del injerto son mucho menores, además raramente existen EICH y otras alteraciones inmunológicas, por lo que la información que podemos obtener con los parámetros reseñados puede ser interesante desde el punto de vista analítico pero poco importante a efectos clínicos, porque además, la variabilidad que pueden introducir determinados parámetros no existe (fuente de progenitores, compatibilidad HLA, grado de EICH...).

En este estudio prospectivo, por tanto, hemos analizado en una amplia serie de pacientes, concretamente 225, sometidos a Alo-TPH, mayor que cualquier otra publicada hasta el momento, la utilidad de estos parámetros y de los puntos de corte establecidos como predictores del prendimiento neutrofílico, estudiando asimismo, algo que hasta el momento no se ha realizado, como es el análisis de una serie de variables clínicas y analíticas con las que comprobar cual es la influencia real de las mismas en el prendimiento, a través de la eritropoyesis y la mielopoyesis.

Por otro lado, no existe ningún estudio que analice estos parámetros en pacientes que hayan recibido los progenitores procedentes de sangre de cordón umbilical, un tipo de Alo-TPH no emparentado en la mayoría de las ocasiones, no HLA-idénticos en muchos casos y prácticamente en todos, con una escasa cantidad de células CD34+ infundidas en el receptor, lo que significa que la presencia conjunta de estas circunstancias favorece la aparición de un fallo del injerto.

Por último, hemos analizado la diferencia, en días, con los que según diversas variables, los parámetros de maduración reticulocitarios adelantan el prendimiento mieloide, un estudio que hasta el momento ningún grupo ha realizado.

B.2.- UTILIDAD DE LOS PARAMETROS RETICULOCITARIOS

Ante un paciente sometido a un Alo-TPH, una vez recibido el acondicionamiento e infundidos los progenitores, y ya durante el periodo de pancitopenia, es de gran utilidad conocer con días de antelación el futuro prendimiento neutrofílico. En primer lugar, nos permite, en pacientes en los que se produce un retraso en el prendimiento y por lo tanto se sospecha la aparición de un fallo del injerto, adelanta las decisiones clínicas en relación a su situación y al mismo tiempo, poner en marcha los mecanismos logísticos necesarios para la realización de una segunda infusión de progenitores, si se estima oportuno. Por tanto, el estudio de los parámetros de maduración reticulocitaria nos ofrecen la posibilidad de conocer, con días de antelación, la aparición de un fallo del injerto en un paciente sometido a este complejo procedimiento

Pero, el adelantar en varios días la capacidad de predecir el prendimiento mieloide, no solamente tiene utilidad para detectar con antelación la presencia de un posible fallo del injerto, sino que además puede ayudarnos a tomar otras decisiones clínicas en el paciente en diversas situaciones, como son la presencia de un proceso febril o infeccioso de cualquier índole, durante el periodo de neutropenia, y es que sabemos, que cuanto más se prolongue ésta en el tiempo, las posibilidades, en primer lugar, de sufrir un proceso infeccioso aumentan y, en segundo lugar, la resolución del mismo se dificulta, siendo en no pocas ocasiones la causa del éxitus, constituyéndose en la principal causa de mortalidad en los pacientes sometidos a esta terapia.

Es interesante, por tanto conocer con una certera aproximación cuando se va a producir la recuperación neutrofílica, es decir, el prendimiento mieloide, que ayude a la resolución del proceso infeccioso, siendo los parámetros de maduración reticulocitaria un buen predictor del mismo, pudiendo, en ocasiones, anular o favorecer la decisión de realizar transfusiones de granulocitos u otras medidas alternativas como aumentar la dosis de G-CSF.

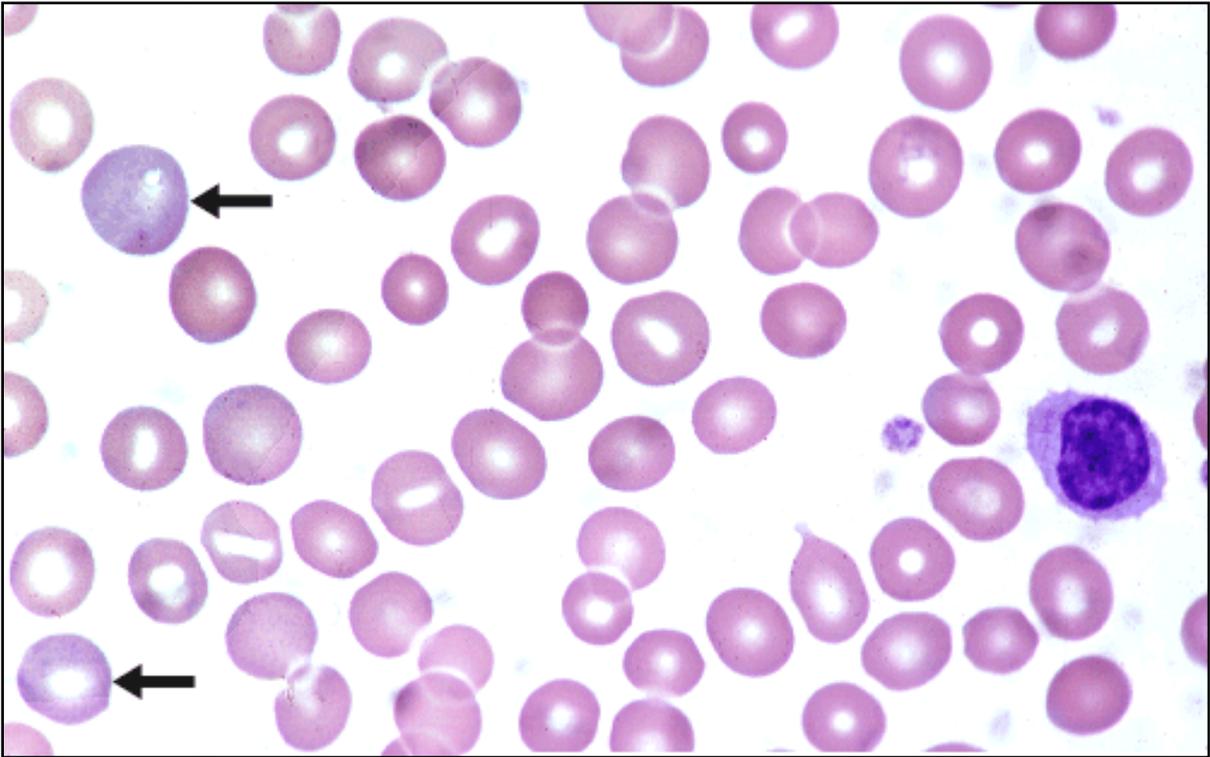


Figura 8: Reticulocitos en una extensión de hematoxilina-eosina.

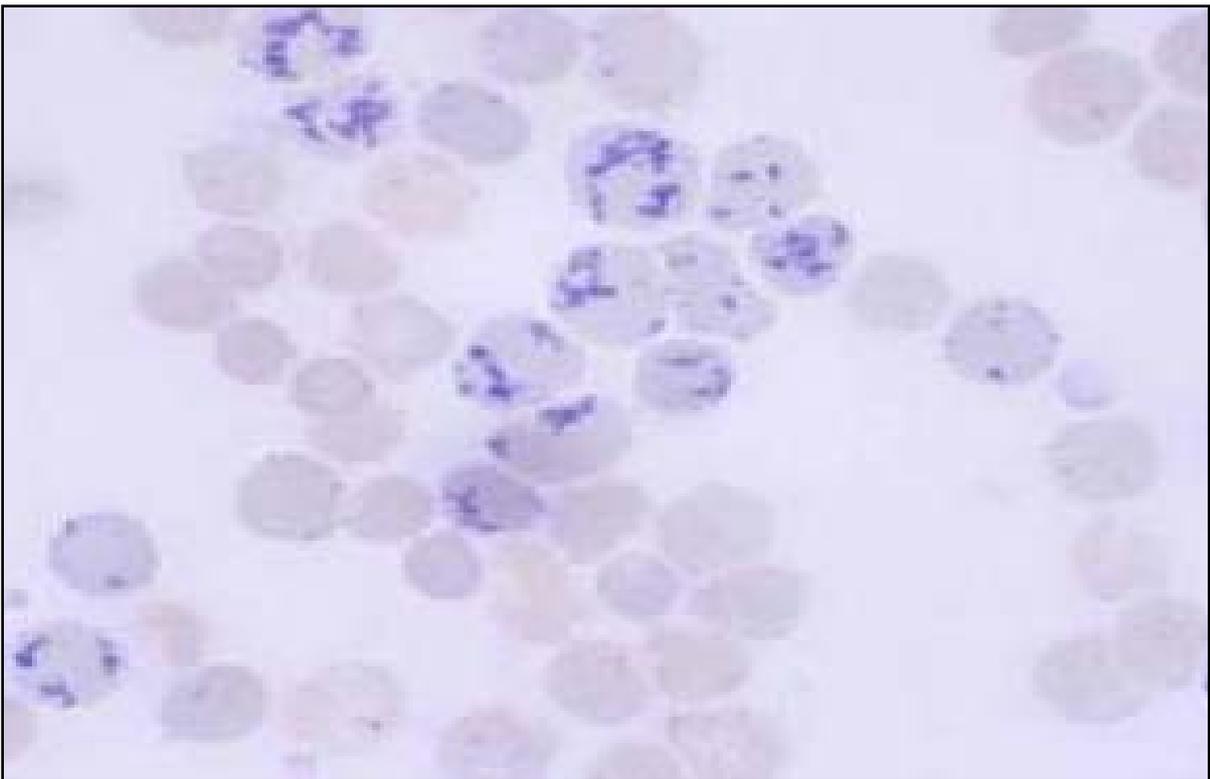


Figura 9: Reticulocitos en una tinción específica.



OBJETIVOS

El eje fundamental sobre el que versa este estudio es la validación, en una amplia serie de pacientes, de una nueva herramienta analítica –parámetros de maduración reticulocitarios- que nos permita adelantar el prendimiento hematopoyético, definido como la presencia de más de 500 neutrófilos/ μ l en sangre periférica, y predecirlo con varios días de antelación con la seguridad de que éste realmente se va a producir, analizándolo en relación a determinadas variables clínicas. En este sentido, los objetivos del estudio son:

C1.- OBJETIVO PRINCIPAL.-

Validar cuatro parámetros reticulocitarios –reticulocitos de alta fluorescencia (RETH), fracción de reticulocitos inmaduros (IRF), índice de fluorescencia media (MFI) y volumen reticulocitario medio (VRM)- como predictores de prendimiento hemopoyético en pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos,

C2.- OBJETIVOS SECUNDARIOS.-

1.- Estudiar más detalladamente estos parámetros en aquellos pacientes que reciben los progenitores procedentes de sangre de cordón umbilical y observar si existen diferencias significativas con respecto a esos otros pacientes que los reciben de otras fuentes como son médula ósea y sangre periférica.

2.- Valorar la influencia de determinados factores clínicos en el prendimiento eritroide. Factores como la presencia de infección concomitante, el uso de metronidazol, el tipo de acondicionamiento, la utilización de radioterapia en

el mismo, el número de progenitores hematopoyéticos infundidos, la utilización de ATG, la profilaxis antiinfecciosa realizada...

3.- Determinar la diferencia temporal con la que los parámetros reticulocitarios nos adelantan el prendimiento mieloide, con especial atención a la influencia, que en este sentido, pudiesen tener determinadas variables clínicas como la fuente de progenitores, el tipo de acondicionamiento o la incompatibilidad del grupo sanguíneo entre el donante y el receptor.

A large, dark gray L-shaped graphic is positioned on the left side of the page. It consists of a vertical bar on the left and a horizontal bar extending to the right from the bottom of the vertical bar. The text 'PACIENTES Y MÉTODOS' is centered within the horizontal bar.

PACIENTES Y MÉTODOS

D.1.- GENERALIDADES DE LOS PACIENTES

En este estudio prospectivo se han incluido un total de 225 pacientes, tanto adultos como en edad pediátrica, que han sido sometidos, de forma consecutiva, a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (Alo-TPH) en el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, desde Enero de 2000 hasta Diciembre de 2008, no existiendo ningún criterio de exclusión. Las características clínicas más destacadas de dichos pacientes así como las del procedimiento empleado, quedan reflejadas en la tabla que aparecen al final de este apartado. Los pacientes fueron ingresados durante todo el proceso, incluido el acondicionamiento, en cámaras de aislamiento con presión positiva, flujo laminar y filtros HEPA.

De los pacientes estudiados, en 132 casos se realizó el Alo-TPH de donante emparentado, siendo 125 HLA-idénticos mientras que 7 presentaban algunas disparidad HLA (2 de ellos haploidénticos), por otro lado, 93 pacientes recibieron los progenitores de un donante no emparentado, siendo en 54 de ellos HLA-idéntico mientras que en los 39 restantes existía alguna disparidad HLA, habiendo sido previamente estudiados, serológicamente o por estudios de alta resolución, los alelos HLA-A, -B y -C y en algunos de casos el HLA-DRB1 y el HLA-DQB1. Por diversas circunstancias, como la edad o la presencia de patología concomitante asociada, se realizó en 38 pacientes el Alo-TPH con acondicionamiento de intensidad reducida (Alo-TPH-AIR).

Se han utilizado diferentes fuentes de progenitores hematopoyéticos, obteniéndose éstos, mediante la realización de un Harvest, de médula ósea para 141 pacientes; en otros 54 casos se obtuvieron de sangre periférica, mediante un proceso de aféresis; mientras que para 30 Alo-TPH el origen de los progenitores infundidos en el receptor fue la sangre de cordón umbilical. Pero un dato clave, y asociado a la fuente, en el éxito del procedimiento es conocer la cantidad de

células CD34+ que han sido infundidas en el receptor, la mediana en esta serie es de $3.10 \times 10^6/\text{kg}$, no obstante, cuando dicha mediana se objetiva en base a la fuente de progenitores, se observa que es de $2,95 \times 10^6/\text{kg}$ células CD34+ infundidas en aquellos que las recibieron de médula ósea, mientras que en los que las recibieron procedentes de sangre periférica es de $6,46 \times 10^6/\text{kg}$, obteniéndose, por último, un descenso importante en la mediana de progenitores infundidos en el receptor cuando éstos se obtenían procedentes de sangre de cordón umbilical, $0,26 \times 10^6/\text{kg}$.

En relación a la compatibilidad existente entre el donante y el receptor respecto al grupo AB0, en un total de 140 casos existía compatibilidad AB0, en 56 incompatibilidad mayor -incluyendo en estos 56 a los 3 pacientes que presentaban incompatibilidad mixta- y en los restantes 29 pacientes incompatibilidad menor.

Respecto al régimen de acondicionamiento, éste fue mieloablativo en 187 pacientes y no mieloablativo en otros 38. Un total de 129 pacientes recibieron radioterapia durante el acondicionamiento, mientras que 74 casos recibieron globulina antitimocítica (ATG). El régimen más utilizado fue ciclofosfamida+radioterapia corporal total en 107 pacientes, busulfan+ciclofosfamida se pautó en otros 16, mientras que un total de 24, todos ellos con progenitores procedentes de sangre de cordón umbilical, recibieron tiothepa+fludarabina+busulfan. Dentro de aquellos que recibieron un régimen de acondicionamiento de intensidad reducida, el más utilizado fue fludarabina+melfalan en 20 pacientes y fludarabina+busulfan en otros 14 receptores.

La profilaxis de la enfermedad injerto contra huésped (EICH) más utilizada en aquellos sujetos que recibieron acondicionamiento mieloablativo, fue ciclosporina a dosis iniciales de $1.5 \text{ mg/kg}/12$ horas intravenosa o $5 \text{ mg/kg}/12$ horas oral, y ajuste correspondiente según niveles sanguíneos, desde el día -1 y

hasta el día +90 - o posterior al mismo, según diversas circunstancias- y metotrexate en pauta corta a una dosis de 15 mg/m² el día +1 y de 10 mg/m² los días +3, +6 y +11, un total de 152 pacientes recibieron esta pauta. La profilaxis en esos otros que recibieron un Alo-TPH-AIR o progenitores procedentes de sangre de cordón umbilical consistió en micofenolato de mofetilo (MMF) a una dosis de 15 mg/kg oral cada 12 horas desde el día 0 hasta el +40 (+30 en los de sangre de cordón) y ciclosporina a una dosis inicial de 1.5 mg/kg intravenoso o 5 mg/kg oral cada 12 horas, con ajustes posteriores según niveles, desde el día -1 hasta el día +90 y en retirada hasta el día +180, en un total 47 pacientes. En otros 45, todos ellos no emparentados con el donante, se utilizó metronidazol a 250 mg/12h, como profilaxis de la EICH y en 27 pacientes se realizó depleción de linfocitos T del injerto previa infusión del mismo.

Recibieron factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) a una dosis de 5 µg/kg diaria 183 pacientes, comenzando el día +7 después de la infusión de los progenitores y finalizando una vez que presentaban en sangre periférica, durante tres días consecutivos, una cifra de neutrófilos superior a 1000/µl. De los restantes, 39 no recibieron G-CSF durante el procedimiento (siendo en 31 Alo-TPH-AIR) mientras que en 3 casos, todos ellos con Alo-TPH-AIR, se les pautó a partir del día +11 a las dosis y condiciones reseñadas. Todos los pacientes recibieron las necesarias transfusiones de concentrados de hematíes radiados para mantener una cifra de hemoglobina superiores a 8 g/dl (>25% hematocrito) y concentrados de plaquetas random, multidonante u obtenidas directamente de aféresis de un sólo donante, para mantener recuentos superiores a 20.000/µl. Ningún paciente, bajo ninguna circunstancia, recibió eritropoyetina durante el curso del trasplante inmediato.

En 213 pacientes se pautó profilaxis antivírica con aciclovir i.v. 500 mg/m²/24h (1500 mg/m²/24h en niños con serología CMV positiva), comenzando el día anterior a la infusión de los progenitores y manteniéndose, aproximadamente, hasta el día +100 post-trasplante. Asimismo, todos los sujetos

recibieron profilaxis antifúngica, un total de 117 con fluconazol, 107 con voriconazol y en 1 caso con posaconazol. Se realizó, también, profilaxis antibiótica con ofloxacino en 155 pacientes, levofloxacino en 25, ciprofloxacino en 7 y con otro agente antiinfeccioso en 6 casos, desde el primer día de acondicionamiento, no recibiendo 32 pacientes, todos ellos en edad pediátrica, ninguna profilaxis antibacteriana desde la infusión de progenitores, sí habiendo recibido 15 de ellos, previamente a este día, profilaxis con trimetropim-sulfametoxazol. Ante la aparición de un primer pico febril se iniciaba tratamiento antibiótico empírico con meropenem a una dosis de 1 gramo i.v cada 8 horas (20 mg/kg/8 horas en niños), siendo suspendido el ofloxacino-levofloxacino. Si se mantenía febril durante tres días consecutivos se añadía al tratamiento teicoplanina a una dosis de 400 mg cada 12 horas, las tres primeras, y posteriormente 400 mg cada 24 horas (10 mg/kg/dosis en niños). Ante la presencia de un hemocultivo positivo se ajustaba el tratamiento antiinfeccioso en base al resultado del antibiograma realizado.

Un total de 91 pacientes, de los 225 que componen esta serie, presentaron EICH aguda, que requirió tratamiento farmacológico, en relación al prendimiento. Respecto a los grados de la EICH aguda, en 22 pacientes fue de grado I, en 53 de grado II, en 12 de grado III y en los 4 restantes de grado IV. El tratamiento más utilizado, concretamente en 87 pacientes, fue prednisona, mientras que los 5 restantes recibieron otros compuestos farmacológicos disponibles en uniterapia o mediante diversas combinaciones farmacológicas.

Parámetros	N	%
Nº de pacientes	225	
Mediana de edad en el Aío-TPH (Rango)	31 (1-67)	
Sexo Masculino/Femenino	134/91	59.5/40.5
Diagnóstico:		
Leucemia Aguda Linfoblástica	67	29.77
Leucemia Aguda Mieloblástica	51	22.66
Leucemia Mieloide Crónica	34	15.11
Mieloma Múltiple	19	38.77
Aplasia medular	21	9.33
Linfoma No-Hodgkin	13	5.77
Síndrome Mielodisplásico	10	4.44
Otros	10	4.44
Tipo de donante:		
Familiar HLA-idéntico	125	55.5
Familiar HLA-no idéntico	7	3.11
No emparentado HLA-idéntico	54	24
No emparentado HLA no-idéntico	39	17.33
Compatibilidad ABO:		
Compatible	140	62.22
Incompatibilidad mayor	56	24.88
Incompatibilidad menor	29	12.88
Fuente progenitores:		
Médula ósea	141	62.66
Sangre periférica	54	24
Cordón umbilical	30	13.33
Régimen acondicionamiento:		
Mieloablativo con ICT	129	57.33
Mieloablativo sin ICT	58	25.77
No-mieloablativo	38	16.88
Profilaxis EICH:		
CsA+MTX	153	68
CsA+MMF	46	20.44
CsA+PDR	19	8.44
Otro	7	3.11
Recibieron ATG	74	32.88
Mediana células CD34+ infundidas (x10⁶/kg)	3.1	

Tabla 2: Principales características clínicas de los pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

D.2.- PACIENTES PEDIÁTRICOS

De los 225 pacientes estudiados, 49 de ellos presentaban una edad inferior a 14 años en el momento del Alo-TPH. En 13 de estos pacientes, el trasplante fue emparentado HLA-idéntico, 1 emparentado no idéntico, 18 no emparentado HLA-idéntico y 17 no emparentado con alguna disparidad HLA. La fuente de progenitores hematopoyéticos fue médula ósea en 26 niños, sangre periférica en 5 y sangre de cordón umbilical en 18.

Los regímenes de acondicionamiento más utilizados fueron ciclofosfamida+irradiación corporal total en 17 pacientes, busulfan+ciclofosfamida en 5 pacientes y en otros 13, todos ellos de cordón umbilical, busulfan+thiotepa+fludarabina. Sólo en dos casos el acondicionamiento fue de intensidad reducida, utilizando busulfan+melfalan, uno de ellos por Aspergillosis Pulmonar previa.

La profilaxis de la enfermedad injerto contra huésped (EICH), en aquellos sujetos que recibieron acondicionamiento mieloablativo, consistió en ciclosporina a una dosis inicial de 1.5 mg/kg intravenosa o 5 mg/kg oral cada 12 horas desde el día -1 hasta el día +90 con modificación de dosis según los niveles en sangre periférica y metotrexate en pauta corta a 15 mg/m² el día +1 y 10 mg/m² los días +3, +6 y +11, excepto los que recibieron los progenitores procedentes de sangre de cordón umbilical, en los que la profilaxis se realizó exclusivamente con ciclosporina, a las dosis referidas, en 1 paciente, y ciclosporina asociada a prednisona hasta el día +30 en 9 pacientes, o bien asociada a micofenolato de mofetilo, hasta el día +30, variable según quimera, en otros 8. Un paciente recibió ciclosporina, prednisona y metotrexate en pauta corta.

Todos los pacientes pediátricos, excepto 6, entre los cuales se encontraban los dos con acondicionamiento de intensidad reducida, recibieron factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) a una dosis de 5 µg/kg diaria, comenzando el día +7 posterior a la infusión de los progenitores y finalizando su administración una vez que en sangre periférica, alcanzaban y mantenían, durante tres días consecutivos, una cifra de neutrófilos superior a 1000/µl.

La profilaxis antivírica se realizó en todos los receptores con aciclovir, excepto en 7 que no recibieron ninguna, a una dosis de 500 mg/m²/24h o 1500 mg/m²/24h intravenosa en base a la negatividad o positividad serológica para el CMV, estudiada tanto en el donante como en el receptor. La profilaxis antifúngica se realizó con fluconazol a 5 mg/kg/24h en 24 pacientes y con voriconazol en los 25 restantes a una dosis de 7 mg/kg/12h. En 15 pacientes se pautó profilaxis diaria con trimetropim-sulfametoxazol desde el primer día de acondicionamiento hasta el día de la infusión de los progenitores, en el resto se utilizó otro agente antibiótico, hasta la aparición del primer pico febril en el que se comenzaba tratamiento empírico con meropenem a 20 mg/kg/8h al que se añadía posteriormente teicoplanina, a 10 mg/kg/12h tres dosis y a continuación 10mg/kg/24h, o vancomicina a 15 mg/kg/6h si durante tres días consecutivos se mantenía con fiebre el paciente.

Parámetros	N	%
Nº de pacientes	49	
Mediana de edad en el Aío-TPH (Rango)	7 (1-13)	
Sexo Masculino/Femenino	24/25	48/51
Diagnóstico:		
Leucemia Aguda Linfoblástica	30	61.22
Leucemia Aguda Mieloblástica	10	20.4
Aplasia Medular	3	6.12
Anemia de Fanconi	2	4.08
Otros	4	8.16
Tipo de donante:		
Familiar HLA-idéntico	13	25.53
Familiar HLA-no idéntico	1	2.04
No emparentado HLA-idéntico	18	36.73
No emparentado HLA no-idéntico	17	34.69
Compatibilidad ABO:		
Compatible	30	61.22
Incompatibilidad mayor	14	28.57
Incompatibilidad menor	5	10.2
Fuente progenitores:		
Médula ósea	26	53.06
Sangre periférica	5	10.2
Cordón umbilical	18	36.73
Régimen acondicionamiento:		
Mieloablatoivo con ICT	20	40.81
Mieloablatoivo sin ICT	27	55.1
No-mieloablatoivo	2	4.08
Profilaxis EICH:		
CsA+MTX	28	57.14
CsA+MMF	8	16.32
CsA+PDR	9	18.36
Otros	4	8.16
Recibieron ATG	26	53.07
Mediana células CD34+ infundidas (x10⁶/kg)	2.95	

Tabla 3: Principales características clínicas de los pacientes pediátricos sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

D.3.- INFECCIONES

En la serie estudiada, 171 pacientes presentaron al menos un pico febril, entendiendo éste como la presencia de una temperatura axilar superior a 38°C durante el procedimiento, no relacionado con la infusión de ATG. En todos ellos se extrajeron hemocultivos seriados de vía central y periférica, que posteriormente podían extraerse de nuevo, en los siguientes días, si el paciente continuaba febril. En 66 de estos pacientes, se obtuvo al menos un hemocultivo positivo a algún agente infeccioso, destacando por su frecuencia el *Staphylococcus Epidermidis* en 25 pacientes, el *Escherichia Coli* en 8 y el *Staphylococcus Hominis-Hominis* en 4. Además, en otros 9 pacientes la toxina de *Clostridium Difficile* fue positiva en heces, mientras que 4 receptores desarrollaron un cuadro de *Aspergillosis Invasiva* y otros 6 una infección vírica, 2 por VHH-6, 2 por VBK, 1 por VHS-1 y 1 por *Metapneumovirus*, confirmados mediante técnicas moleculares para detectar la presencia de ácidos nucleicos virales. Ningún paciente presentó en las determinaciones bisemanales por PCR que se hicieron, desde la infusión de los progenitores, una carga viral positiva (>600 copias) para CMV con anterioridad a alcanzar la cifra de 500/ μ l neutrófilos en sangre periférica.

D.4.- OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

En todos los casos, se obtenían las muestras directamente del paciente, a primera hora de la mañana y por enfermería especializada. Dichas muestras, en cantidad mínima de 3 ml, se extraían procedentes de sangre periférica a través de una vía central, port-a-cath o catéter de Hickman, hasta un tubo de hematimetría con EDTA.

Los días en los que se analizaba la muestra eran los siguientes: el día previo al inicio del acondicionamiento (día PRE), el día de la infusión (día 0) y a partir de ese momento a diario hasta que el paciente era dado de alta. Las muestras han sido siempre procesadas y analizadas en las dos primeras horas posteriores a la extracción.

D.5.- ANÁLISIS RETICULOCITARIO

El análisis de los reticulocitos fue realizada mediante el analizador ABX PENTRA 120 Retic. Para ello, previamente se ha de mezclar, de forma manual, 0.8 µl de sangre periférica con EDTA obtenida diariamente del paciente con 2.5 ml de una preparación para ácidos nucleicos de fluorocromo tiazol de naranja. Tras 25 segundos incubados a 35°C, una muestra de dicha dilución es transferida al analizador, y las células son estudiadas secuencialmente para determinar el volumen reticulocitario medio (MRV) por impedancia usando un laser de argón de 20 mW, los reticulocitos son separados de los componentes maduros de la serie roja, los leucocitos y las plaquetas. Los resultados reticulocitarios son desplegados en un eje de coordenadas en el que la distribución en el eje-y se realiza según la cantidad de ARN que contienen y en el eje-x en base al volumen celular. El analizador obtiene de forma directa de cada muestra de sangre periférica el porcentaje y número absoluto de recitulositos. Además, como la cantidad de luz absorbida por los reticulocitos es proporcional a la intensidad de la tinción y contenido de ARN, los reticulocitos son subdivididos en tres poblaciones con bajo, medio y alto contenido en ARN. Con esta subdivisión se obtienen reticulocitos en tres secciones: bajo contenido en RNA (RETL), medio contenido en RNA (RETM) y alto contenido en RNA (RETH). Por lo tanto el RETH es un parámetro que nos es dado directamente por el analizador. La fracción reticulocitaria inmadura (IRF) es un parámetro calculado a partir de la suma de RETM y RETH. Los otros dos parámetros, MFI y MRV, son aportados directamente por el analizador.

El RETH se mide en porcentaje, al igual que el IRF, mientras que en el MFI el resultado es expresado en unidades de fluorescencia y el MRV se mide en fentolitros.

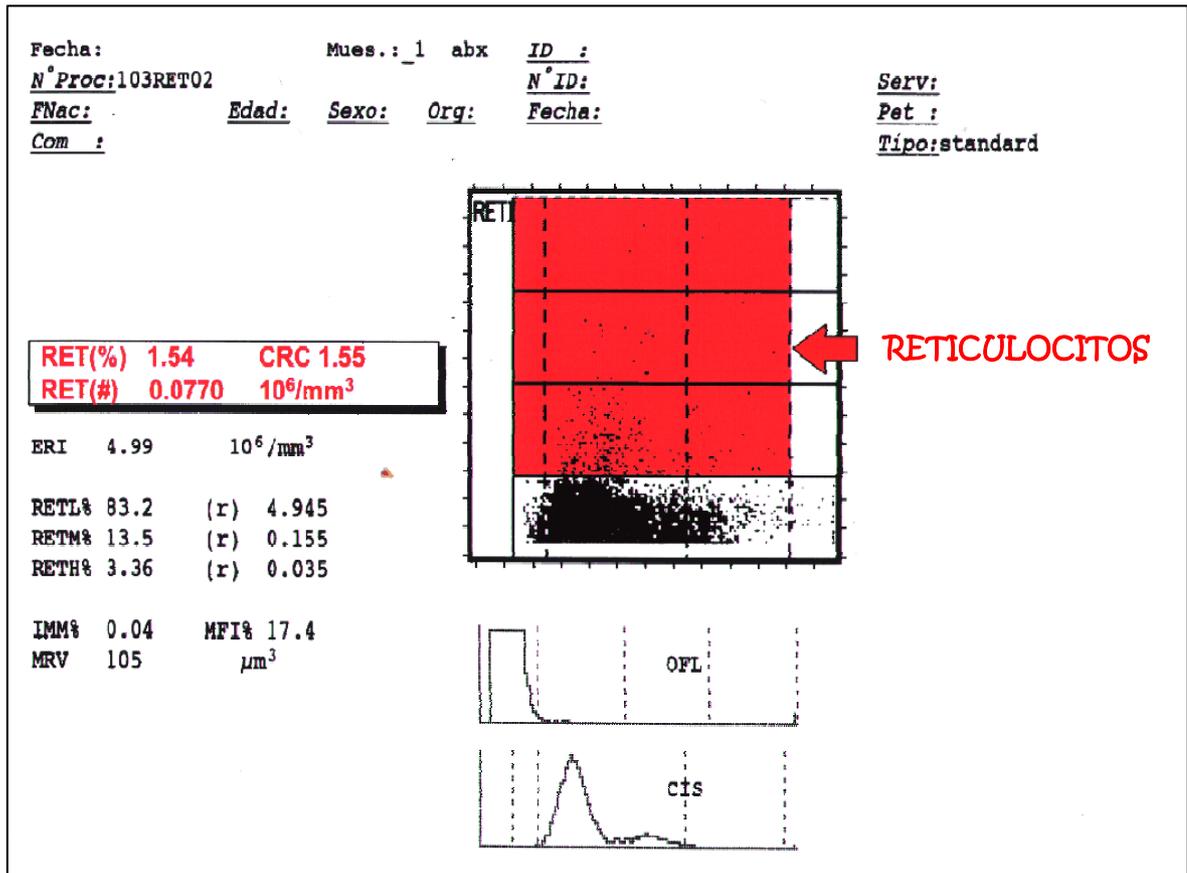


Figura 10: Ejemplo del estudio de una muestra en la que se observa los distintos parámetros reiculocitarios dados por el analizador.

Todas las muestras son analizadas a diario dos veces, obteniéndose la media entre las dos determinaciones obtenidas como el valor definitivo de ese día para cada uno de los parámetros estudiados. En un total de 50 pacientes, elegidos al azar, se ha estudiado la variabilidad existente entre las dos determinaciones diarias para tres parámetros, el día en el que se producía el prendimiento de cada uno de ellos. A continuación se presenta la media de la

diferencia obtenida entre las dos determinaciones diarias para cada parámetro el día reseñado:

DIFERENCIA MFI

N	Válidos	50
	Perdidos	0
Media		1,9465
Error típ. de la media		,26820
Desv. típ.		1,75870

DIFERENCIA IRF

N	Válidos	50
	Perdidos	0
Media		3,5369
Error típ. de la media		,57766
Desv. típ.		3,74368

DIFERENCIA RETH

N	Válidos	50
	Perdidos	0
Media		1,4450
Error típ. de la media		,23714
Desv. típ.		1,53687

En controles de pacientes normales, se observa menor variabilidad entre las mismas determinaciones del mismo día. Esto es debido a la menor cantidad de reticulocitos absolutos que presenta la muestra, lo que favorece una mayor precisión de las determinaciones.

Estadísticos

		DIFMFI	DIFIRF	DIFRETH
N	Válidos	200	200	200
	Perdidos	0	0	0
Media		1,1069	1,0759	,5862
Error típ. de la media		,20305	,12522	,08477
Desv. típ.		1,09346	,67435	,45648

Se ha establecido el día del prendimiento mieloide como el primero de los tres en los que de forma consecutiva el recuento de neutrófilos en sangre periférica es superior a 500/ μ l, con independencia de las otras series y de las necesidades transfusionales del paciente.

Durante el proceso se estudiaron muestras procedentes de concentrados de hematíes para comprobar las cifras de reticulocitos que presentaban y el porcentaje de los diversos tipos de reticulocitos... de tal forma que según los datos obtenidos se puede observar que éstos no presentan ninguna influencia en los resultados definitivos obtenidos en los pacientes durante el periodo en el que fueron subsidiarios de transfusiones de concentrados de hematíes.

D.6.- TIPO DE ESTUDIO

Se ha realizado un estudio prospectivo de una serie de casos.

D.7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados son expresados como media \pm desviación standard (SD) y rango para los valores reticulocitarios. Como ya se ha comentado, los reticulocitos de alta y media intensidad son expresados en porcentaje, el MFI como unidades de fluorescencia y el MRV en fentolitros. En este modelo estadístico el prendimiento eritroide viene definido como: el primer día post-trasplante en el que el MFI alcanza valores de 10, el IRF del 10%, el RETH es superior al 3% y el MRV supera los 110 fL para cada paciente, siempre y cuando se mantengan estos recuentos, al menos, durante tres días consecutivos. Estos puntos de corte se establecieron considerando el cuartil 25 para cada parámetro reticulocitario en el día en el que se producía el prendimiento neutrófilo, basados en estudios que

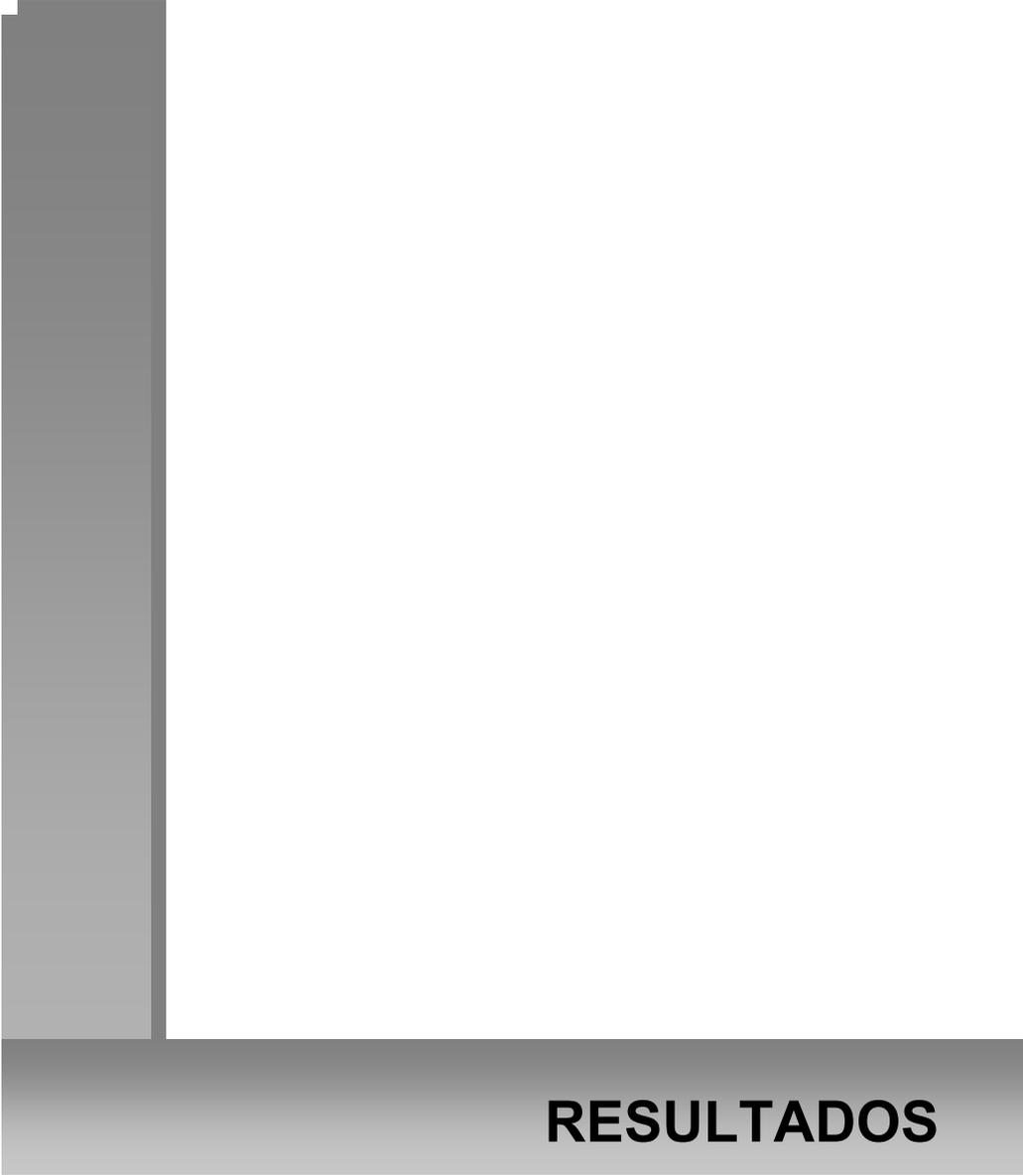
previamente habíamos realizado en una serie anterior de 60 pacientes no incluidos en esta otra de 225, sometidos la mitad de ellos a Auto-TPH y la otra mitad a Alo-TPH. Estos parámetros fueron posteriormente comparados con el primer día en que el paciente presentaba en sangre periférica una cantidad de neutrófilos $\geq 100/\mu\text{l}$ y $\geq 500/\mu\text{l}$. El prendimiento mieloide se definió como el primero de los tres días consecutivos en que el paciente mantuviese en sangre periférica unas cifras de neutrófilos iguales o superiores a $500/\mu\text{l}$.

Mediante el uso de series temporales de Kaplan-Meier se compararon los días de prendimiento de cada parámetro reticulocitario en relación al día en el que se alcanza el prendimiento de la serie granulocítica, evaluándose mediante el log rank test la significación estadística del resultado. La relación entre los diferentes parámetros reticulocitarios y el prendimiento mieloide se estimó por regresión lineal simple.

Las distintas variables clínicas que pueden influir en el prendimiento eritroide, en base a los parámetros reticulocitarios, se estudiaron mediante análisis univariante y multivariante utilizando modelos de regresión de Cox.

Para el análisis de la diferencia temporal -en días- con la que preceden los parámetros reticulocitarios al prendimiento mieloide, en base a determinadas variables, se utilizó el test t de student para comparación de medias de muestras independientes

Para el estudio estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS versión 15.0 para Windows. En todas las pruebas estadísticas se consideraron significativos valores de p inferiores a 0.05.



RESULTADOS

En esta serie de 225 pacientes, sometidos de forma consecutiva a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (Alo-TPH), hubo un total de 8 (3.56%) que fallecieron durante el periodo de pancitopenia sin haberse objetivado signos de prendimiento mieloide ni eritroide. De los restantes, 8 (3.56%) pacientes presentaron fallo primario del injerto. El resto de pacientes, 209 (92.88%), alcanzaron prendimiento hematopoyético derivado del donante, estudiado, en nuestro servicio, mediante técnicas de biología molecular. Tras el régimen de acondicionamiento, los recuentos de reticulocitos disminuyeron progresivamente desde $113 \times 10^9/L$ hasta un nadir de $6.22 \times 10^9/L$ de media en el día +8. A continuación, en los días posteriores se observó un aumento progresivo y continuo en el número total de reticulocitos y en los porcentajes de reticulocitos inmaduros.

F.1.- CINÉTICA DE LOS PARÁMETROS DE MADURACIÓN RETICULOCTARIOS Y PRENDIMIENTO MIELOIDE TRAS EL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.

Tras la administración del acondicionamiento se produce un periodo de pancitopenia en el que descienden los recuentos periféricos de las tres series como consecuencia del déficit de producción central. Al mismo tiempo, y conjuntamente a lo anterior existe una reticulocitopenia, pero con el paso de los días se produce un incremento significativo de reticulocitos, muchos de ellos inmaduros, en sangre periférica precediendo al aumento posterior de los recuentos de neutrófilos.

Cabe destacar que, de los 209 pacientes, tan sólo en dos de ellos, ninguno de los parámetros reticulocitarios estudiados alcanzaron los puntos de corte establecidos, obteniéndose, en ambos, el prendimiento mieloide, presentando

ambos pacientes incompatibilidad mayor AB0. Seguidamente, uno de estos pacientes desarrolló un fallo secundario del injerto, sin embargo, ninguno de ellos ha sido eliminado del análisis estadístico. Ha habido, asimismo, otro paciente que no alcanzó las cifras para el MFI, otro distinto que no lo hizo para el IRF, 13 que no lo hicieron para el RETH, mientras que por último, 81 pacientes no lo alcanzaron para el VRM, ni antes del prendimiento mieloide ni en los cinco días posteriores al mismo.

Utilizando los criterios ya establecidos, la mediana de prendimiento fue: +13 (rango: 6-43) para el MFI, +14 (rango: 5-45) para el IRF, +14 (rango: 7-48) para el RETH y +20 (rango: 6-74) para el MRV. El prendimiento mieloide, $>100/\mu\text{l}$, $>500/\mu\text{l}$ y $1000/\mu\text{l}$ neutrófilos, tuvo lugar los días +15 (rango: 6-43), +17 (rango: 8-48) y +19 (rango: 9-53), respectivamente. Estas diferencias alcanzaron significación estadística respecto al IRF $>10\%$, MFI >10 y RETH $>3\%$, comparado con neutrófilos $>500/\mu\text{l}$ ($p < 0.0001$ en todos los casos). También alcanzó significación el cuarto parámetro reticulocitario (VRM), aunque en esta ocasión, es el prendimiento mieloide el que antecede en el tiempo al VRM, por lo tanto desde este momento ha sido eliminado, como parámetro de maduración reticulocitario, a la hora de realizar los estudios analíticos. En el eje x se representa el tiempo medido en días y en el eje y el porcentaje de pacientes que alcanzan el prendimiento.

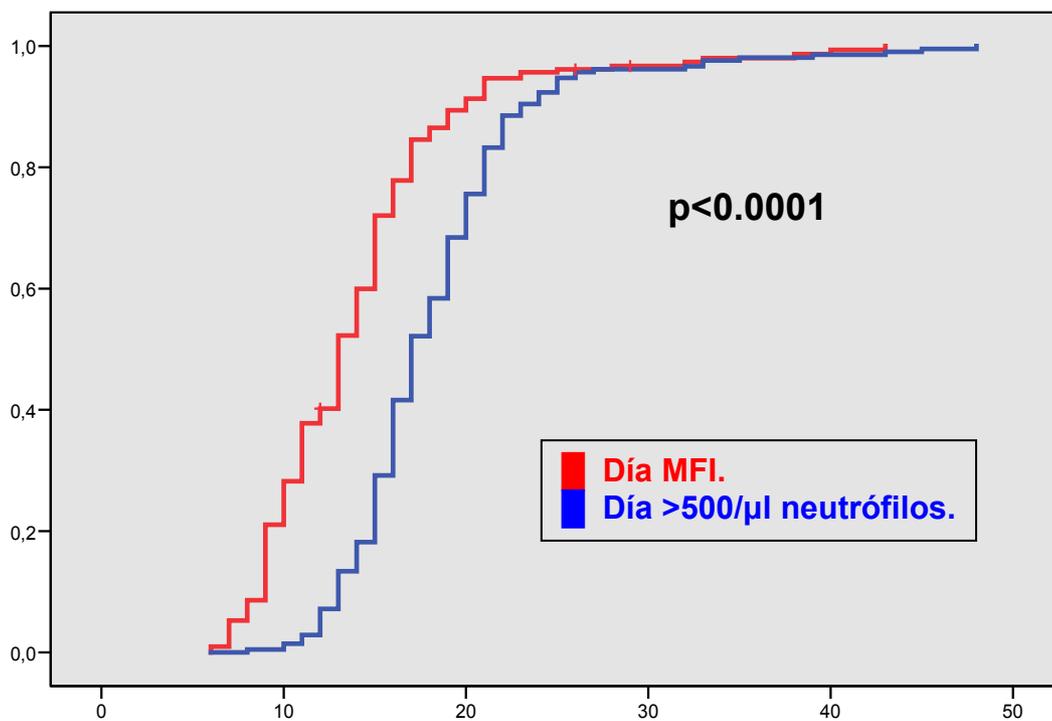


Figura 11: Comparación MFI- Neutrófilos >500/μl.

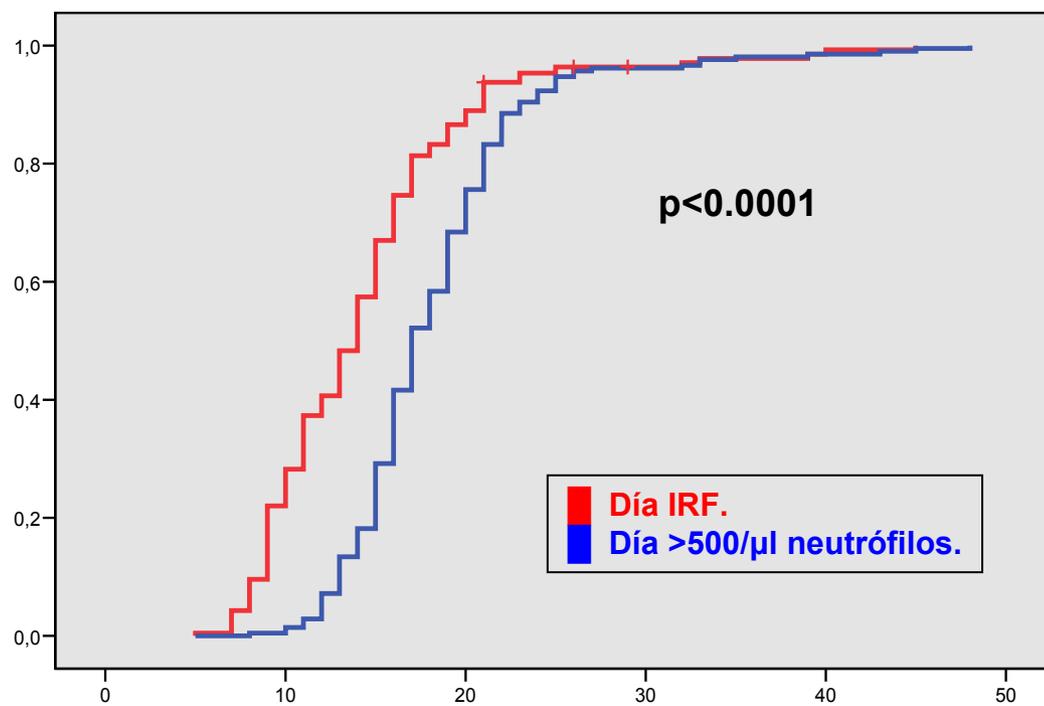


Figura 12: Comparación IRF- Neutrófilos >500/μl .

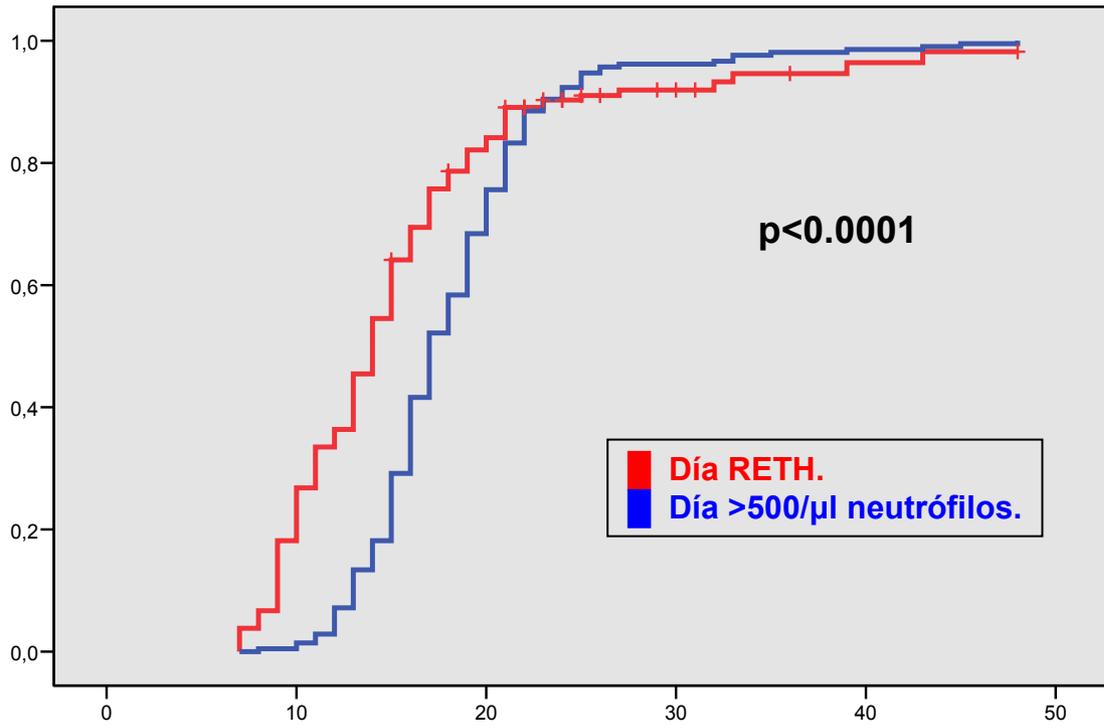


Figura 13.- Comparación RETH- Neutrófilos >500/μl.

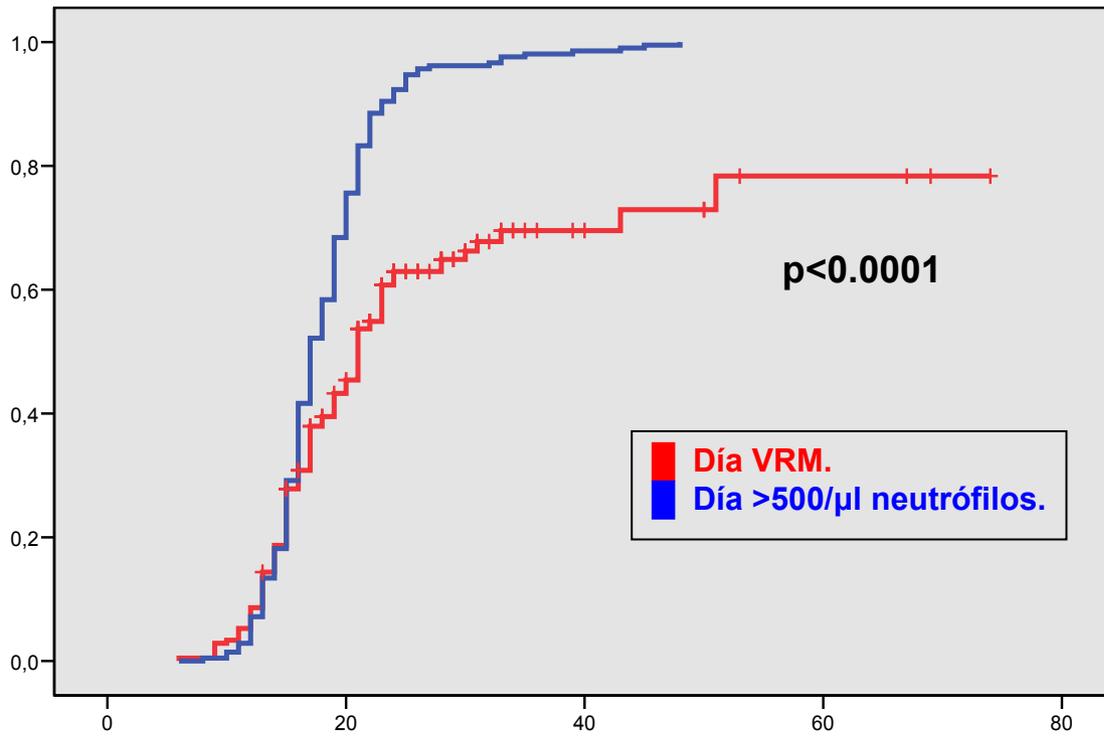


Figura 14.- Comparación VRM- Neutrófilos >500/μl.

Existe también significación estadística cuando se compara el MFI >10 y el IRF >10% con el primer día en el que se alcanzan >100/ μ l neutrófilos en sangre periférica, con un valor de p de 0.012 y 0.031, respectivamente, siendo el RETH >3% no significativo. Para este estudio se han eliminado 3 pacientes, sometidos a Alo-TPH con acondicionamiento de intensidad reducida, los cuales, en ningún momento, presentaron durante el procedimiento cifras de neutrófilos inferiores a 100/ μ l, en sangre periférica.

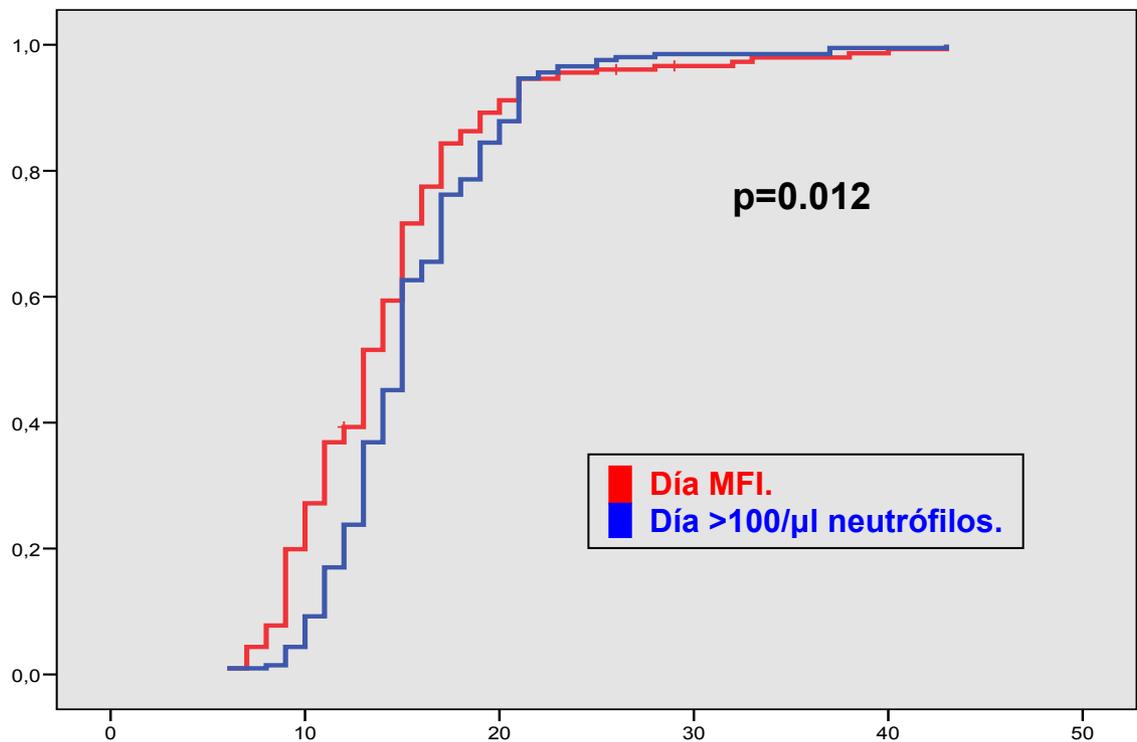


Figura 15.- MFI- Neutrófilos >100/ μ l.

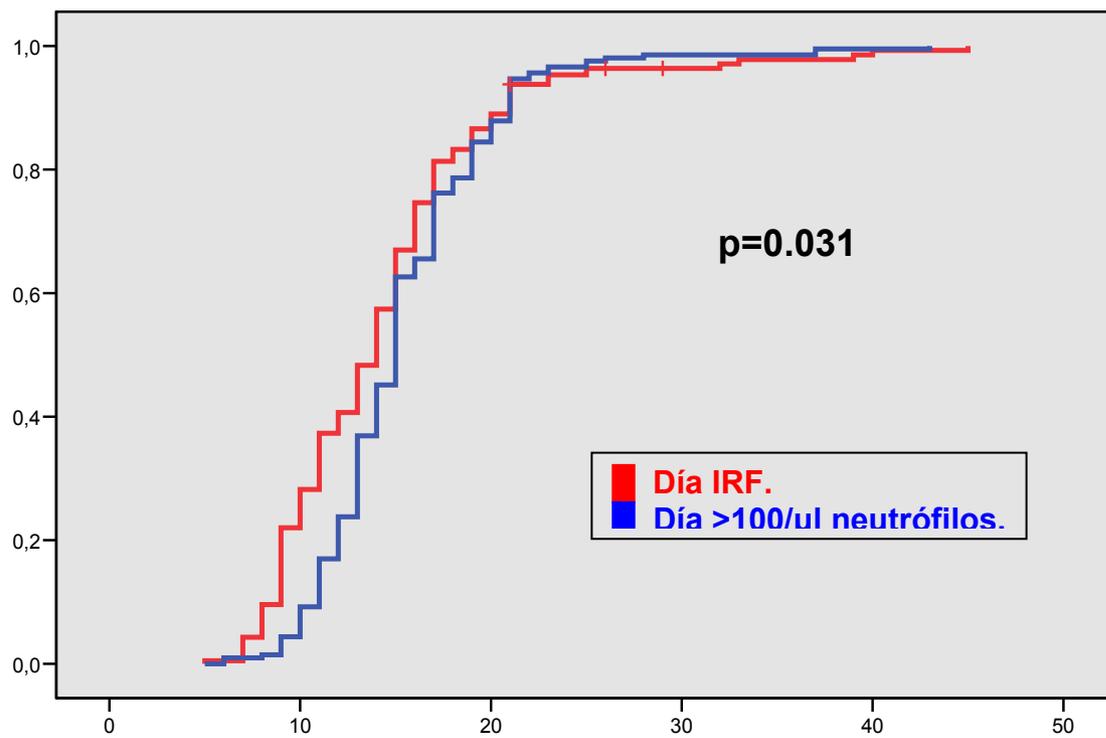


Figura 16.- IRF- Neutrófilos >100/μl.

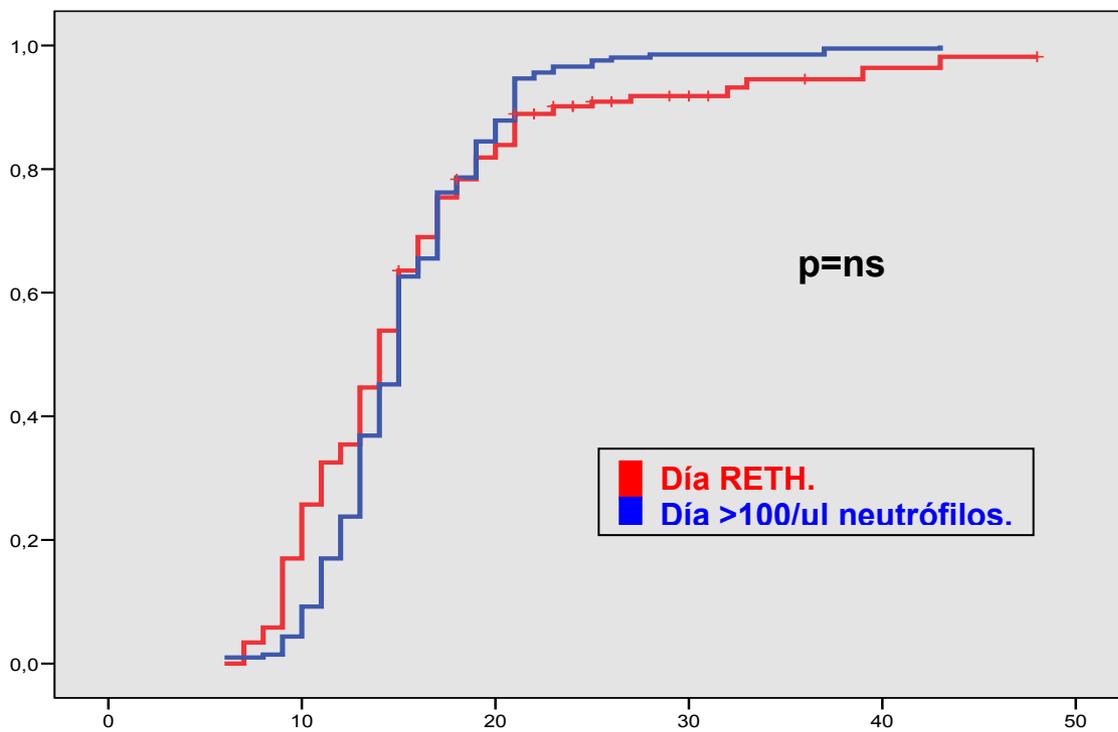


Figura 17.- RETH- Neutrófilos >100/μl.

Por otro lado, cuando se comparan estos parámetros reticulocitarios con la presencia de $>100/\mu\text{l}$ monocitos, objetivados mediante hematimetría convencional, se observa que dos de ellos, el MFI y el IRF, presentan significación estadística, por lo que dichos parámetros nos adelantan también la presencia de $>100/\mu\text{l}$ monocitos en sangre periférica ($p=0.002$ y $p=0.029$, respectivamente). Para dicho análisis, se han eliminado del mismo a cuatro pacientes, sometidos a Alo-TPH, con acondicionamiento de intensidad reducida, que en ningún momento presentaron unas cifras de monocitos inferiores a $100/\mu\text{l}$ durante el trasplante. El tercer parámetro reticulocitario, el RETH, no alcanzó significación estadística.

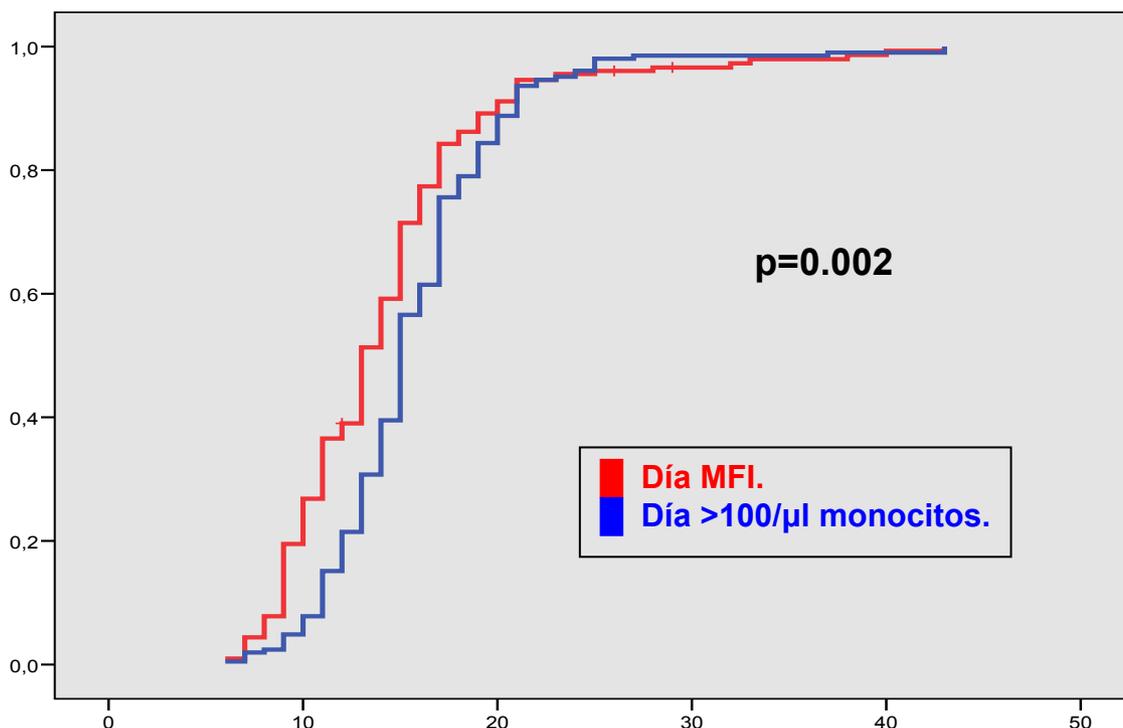


Figura 18.- MFI- Monocitos $>100/\mu\text{l}$.

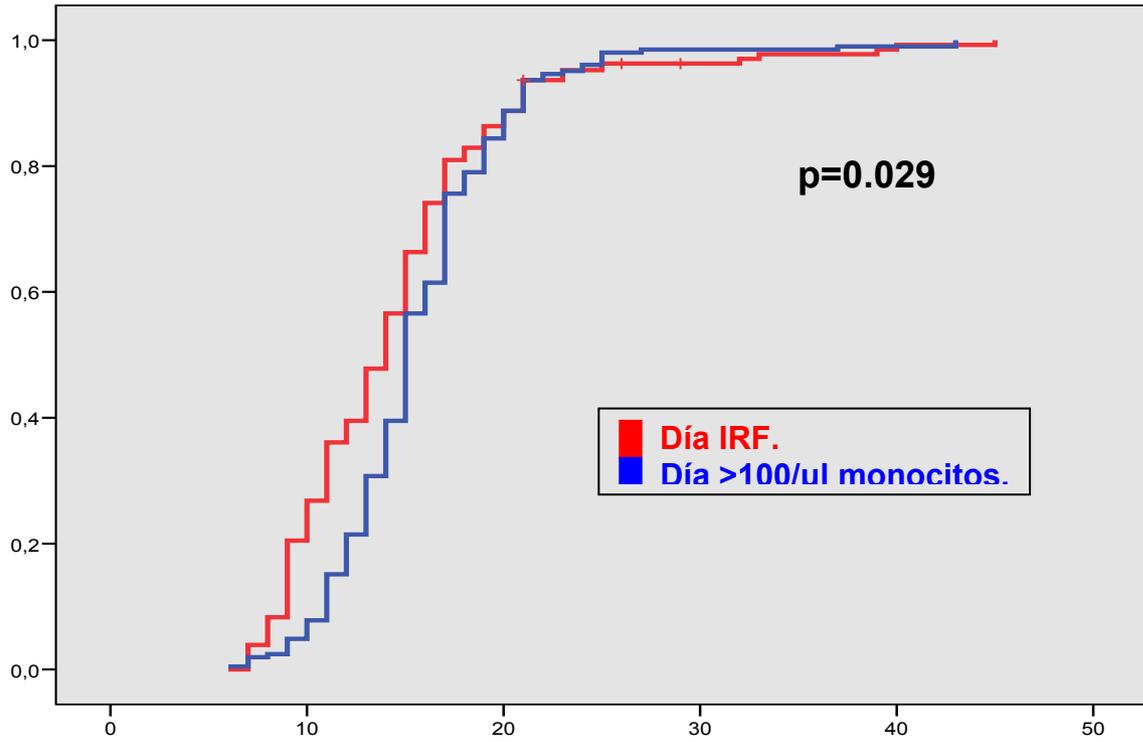


Figura 19.- IRF- Monocitos >100/ μ l.

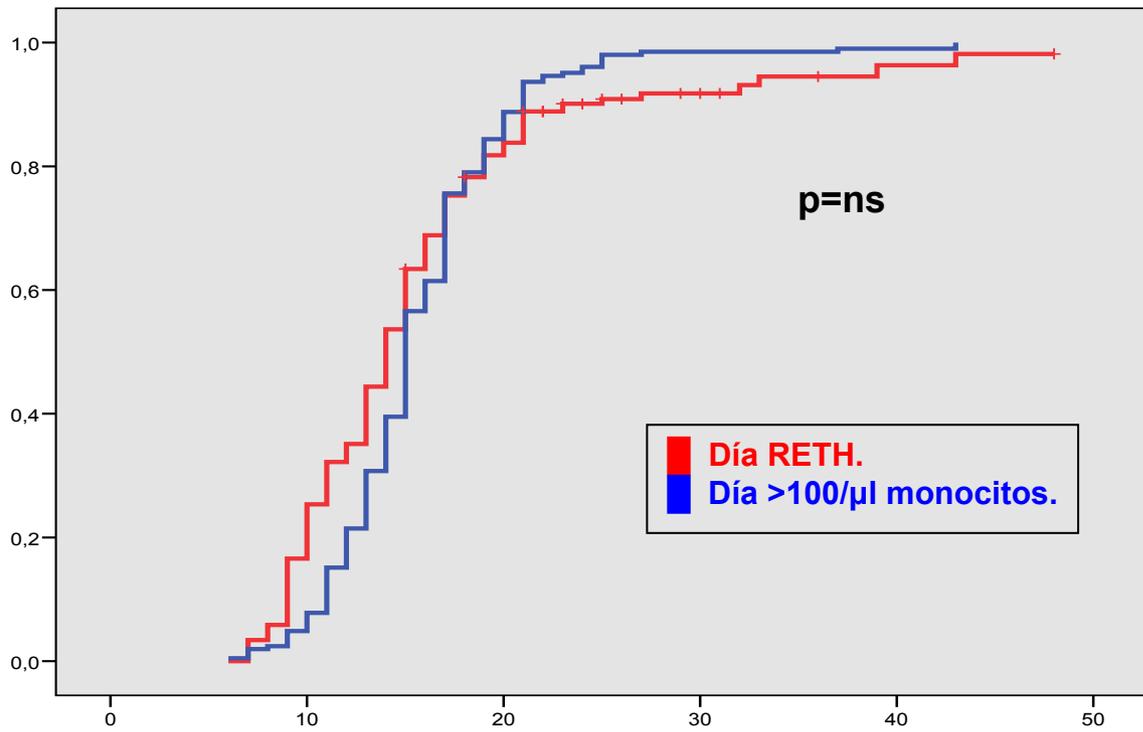


Figura 20.- RETH- Monocitos >100/ μ l.

Por otro lado, cuando se comparan estos parámetros reticulocitarios con el prendimiento plaquetario, entendido éste como la presencia de más de 20.000/ μ l plaquetas en sangre periférica, mantenidas durante tres días, sin necesidad transfusional en las 72 horas previas al primer día, se observa que los tres parámetros, el MFI, el IRF y el RETH, presentan significación estadística, por lo que dichos parámetros nos adelantan también la presencia de >20.000/ μ l plaquetas en sangre periférica ($p=0.001$ para los tres parámetros). Para dicho análisis, se han eliminado del mismo a tres pacientes, sometidos a Alo-TPH, con acondicionamiento de intensidad reducida, que en ningún momento presentaron unas cifras de plaquetas inferiores a 20.000/ μ l durante el trasplante, por lo que no requirieron transfusiones plaquetarias.

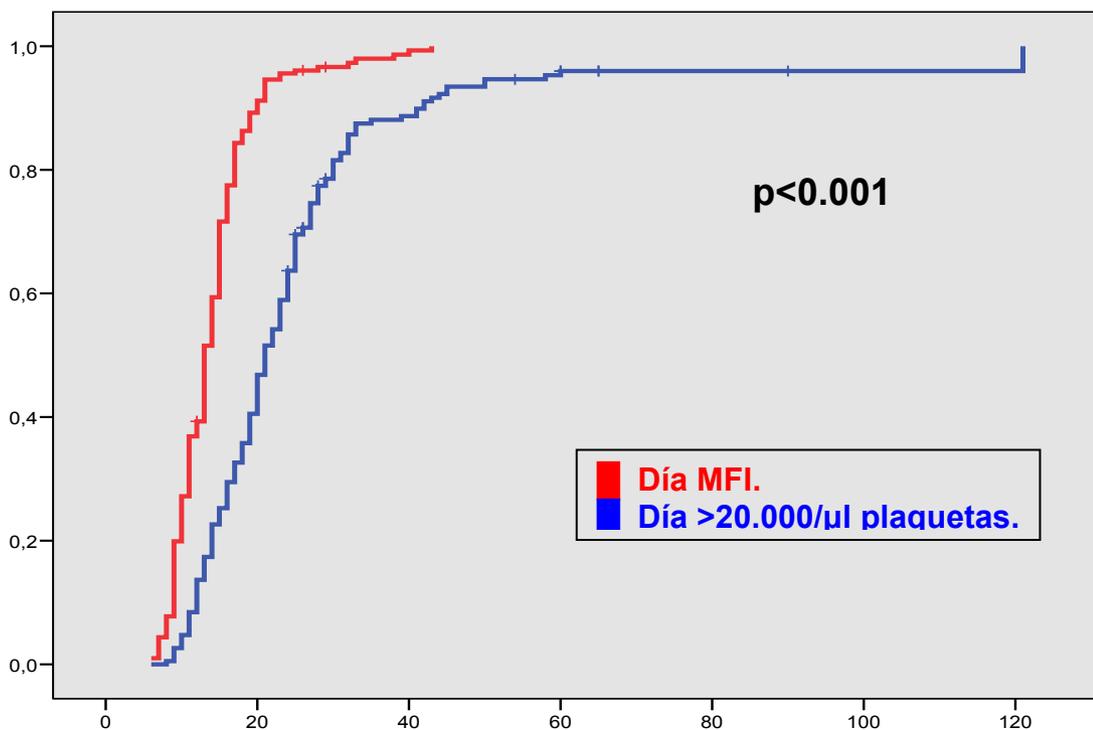


Figura 21.- MFI- Plaquetas >20.000/ μ l.

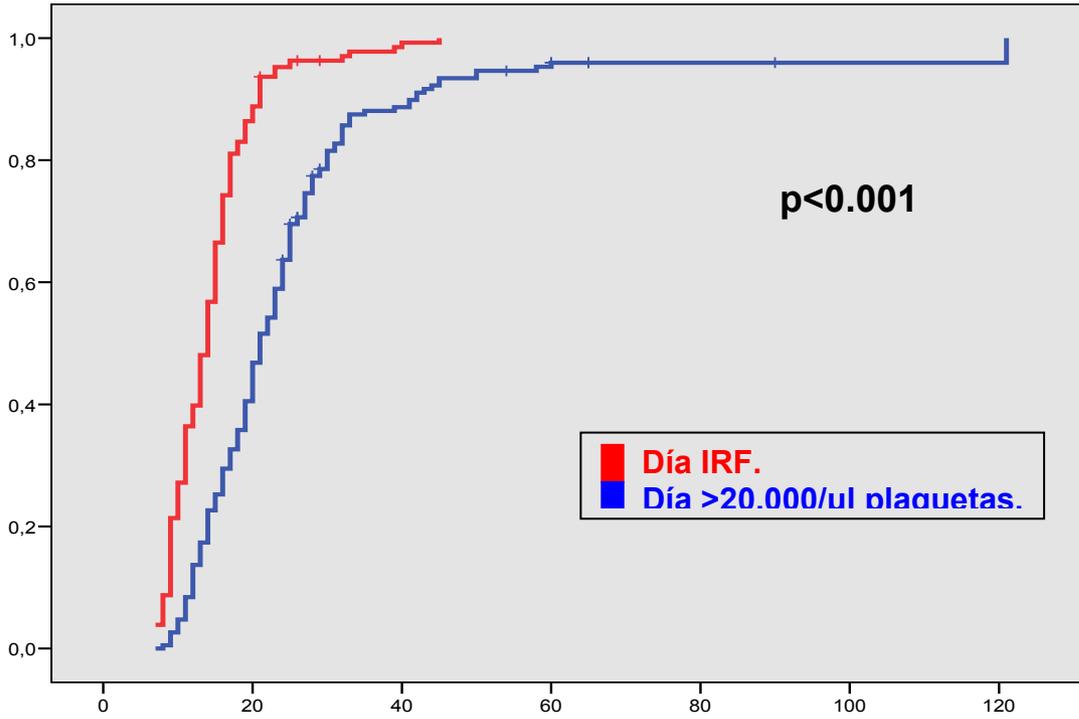


Figura 22.- IRF- Plaquetas >20.000/μl.

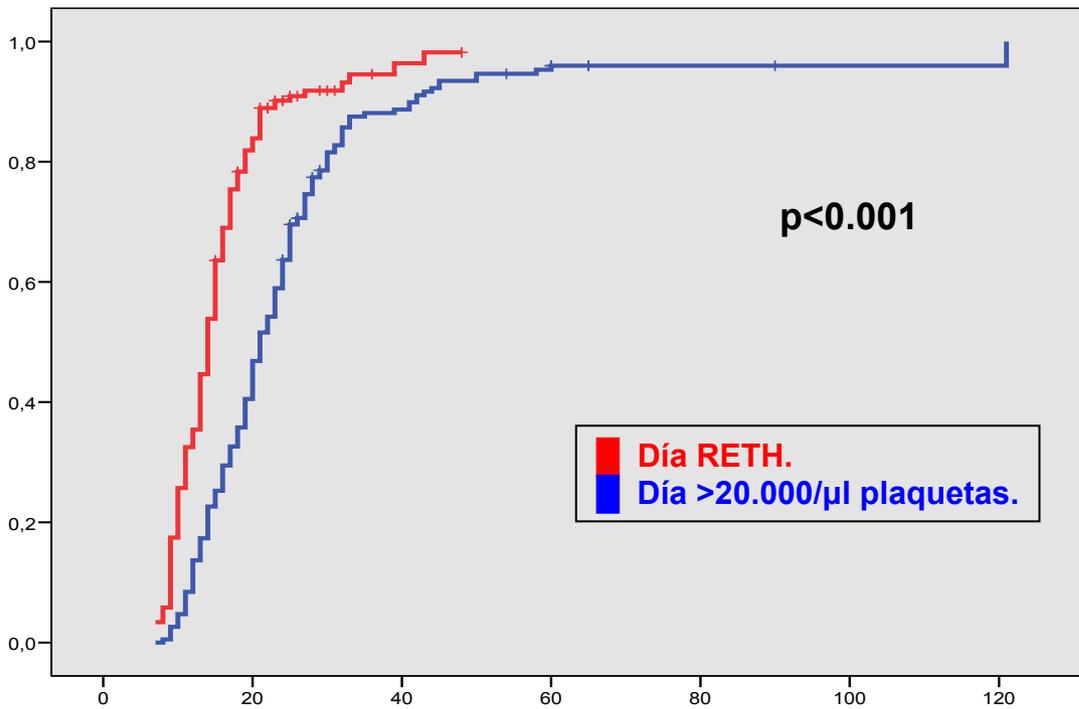


Figura 23.- RETH- Plaquetas >20.000/μl.

Cuando consideramos todos los pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos obtenidos de un donante emparentado HLA-idéntico (n=119), el MFI alcanzó >10 en el día +13 (rango= 6-26) mientras que el día en que los neutrófilos fueron >100/ μ l y >500/ μ l ocurrió significativamente más tarde (p= 0.005 y p< 0.001 respectivamente). Por otro lado, el IRF>10% se alcanzó en el día +14 (rango: 5-26), significativamente más temprano que neutrófilos >500/ μ l y 100/ μ l (p= 0.042 y p< 0.001). El RETH>3% se produjo el día +14 (rango=7-36), alcanzando también significación estadística al compararlo con neutrófilos >500/ μ l (p <0.006), aunque no lo hizo así al ser comparado con neutrófilos >100/ μ l (p =ns).

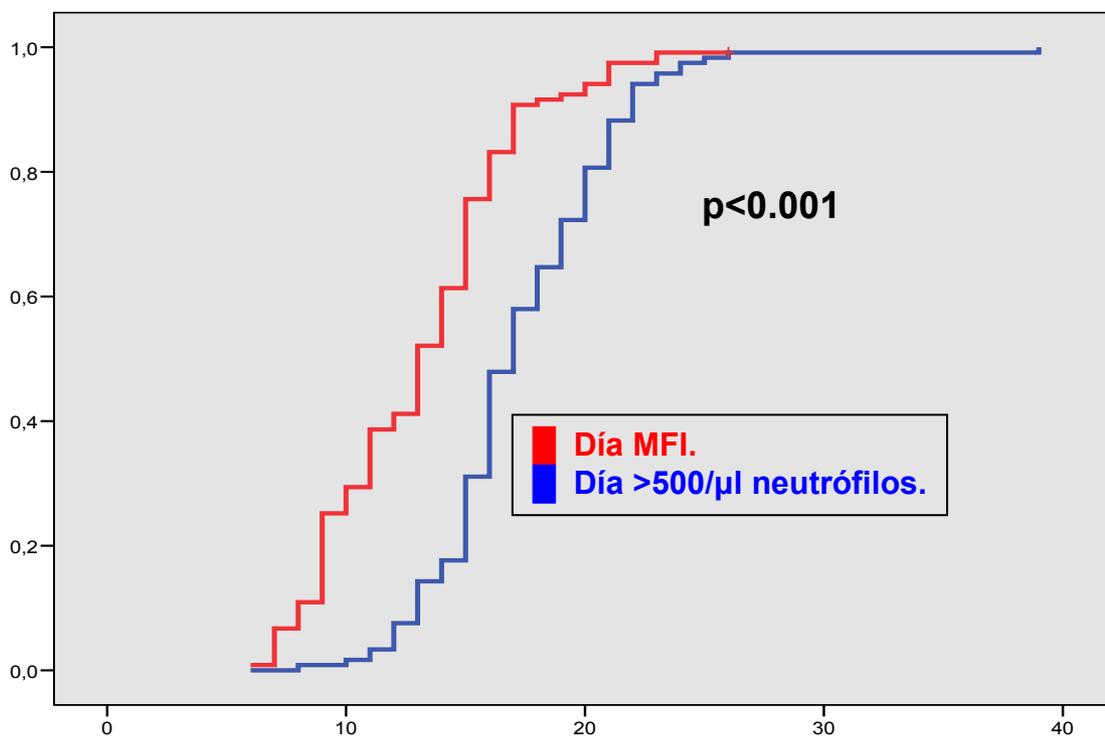


Figura 24.- MFI-Neutrófilos >500/ μ l: Emparentados HLA-idénticos.

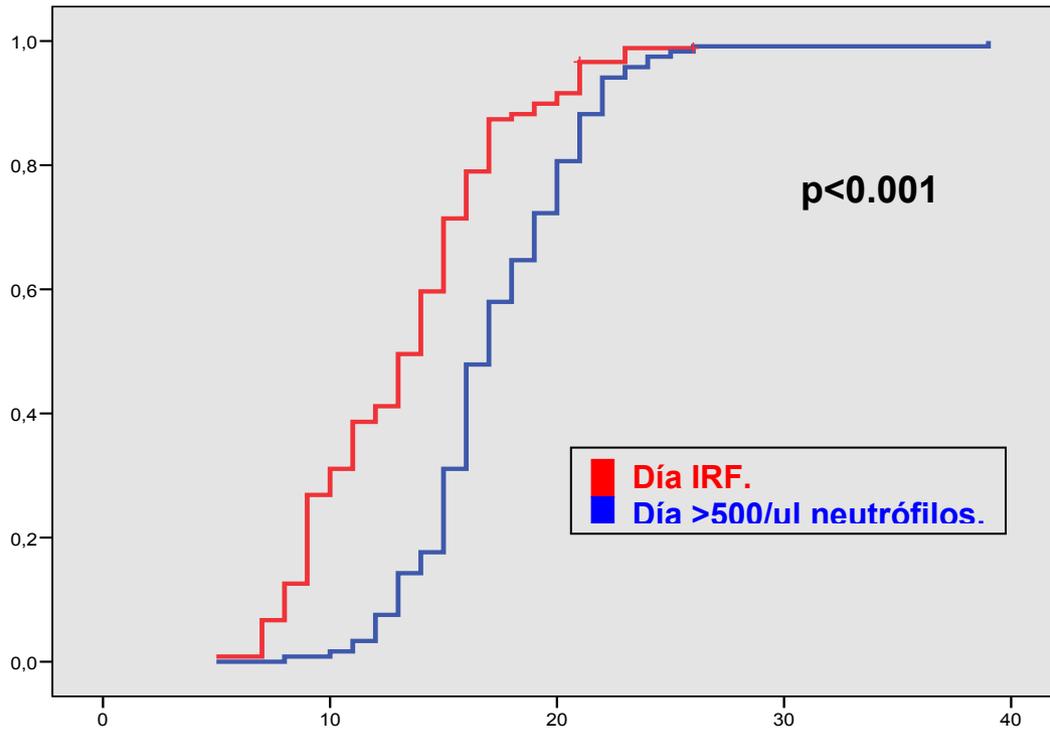


Figura 25.- IRF-Neutrófilos >500/ μ l: Emparentados HLA-identicos.

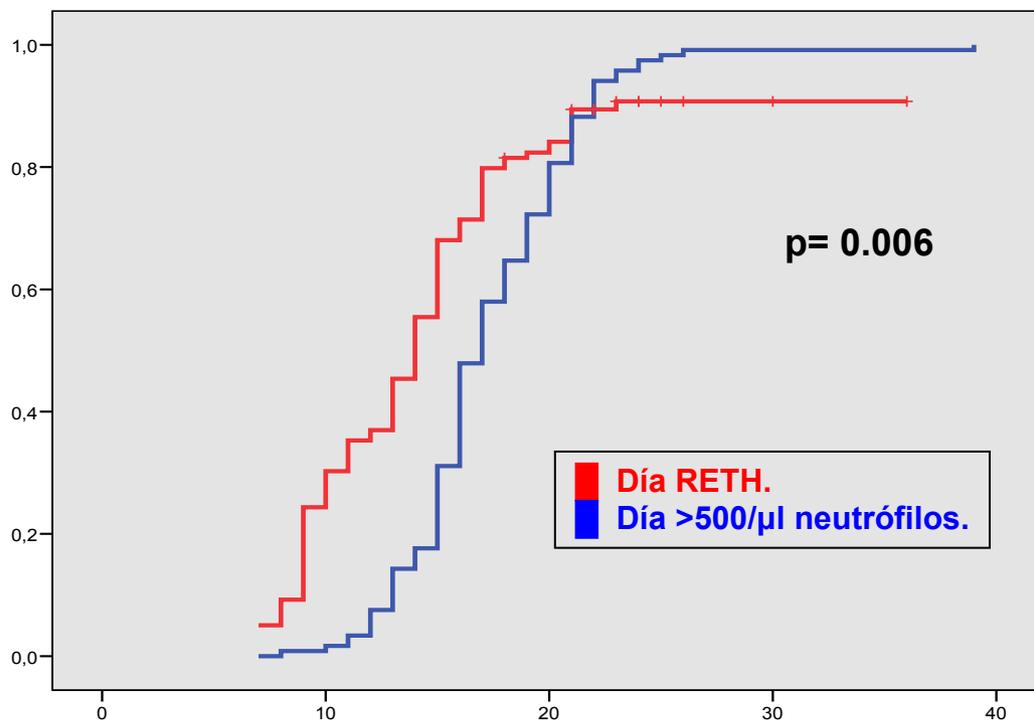


Figura 26.- RETH-Neutrófilos >500/ μ l: Emparentados HLA-identicos.

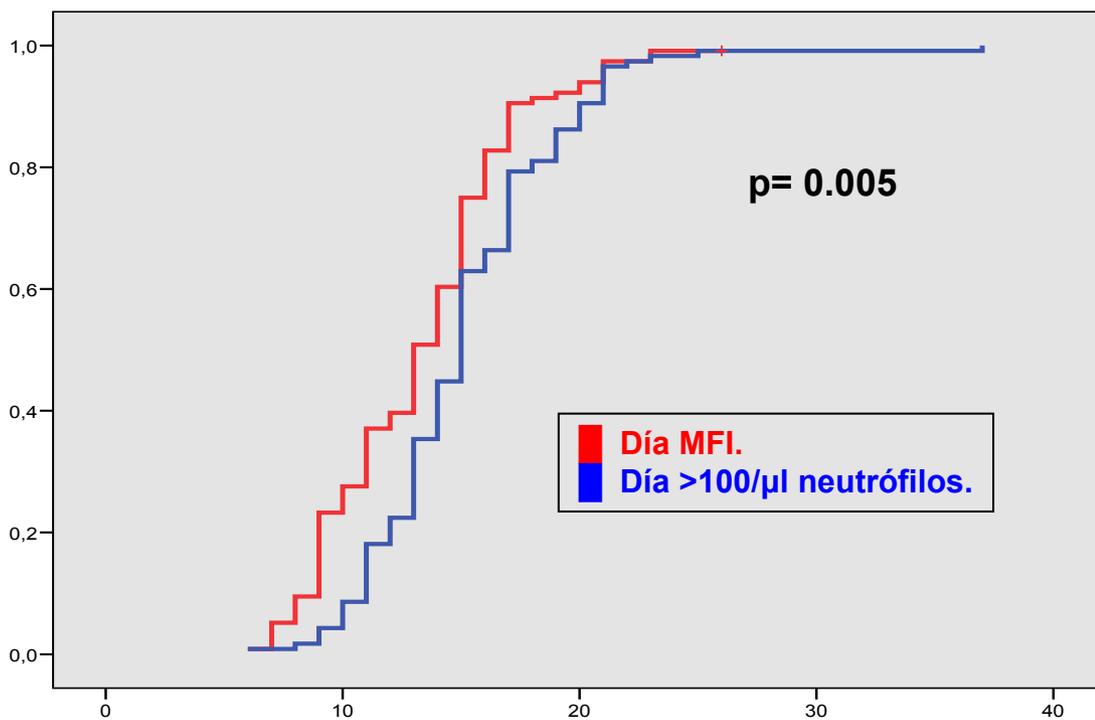


Figura 27.- MFI-Neutrófilos >100/μl: Emparentados HLA-idénticos.

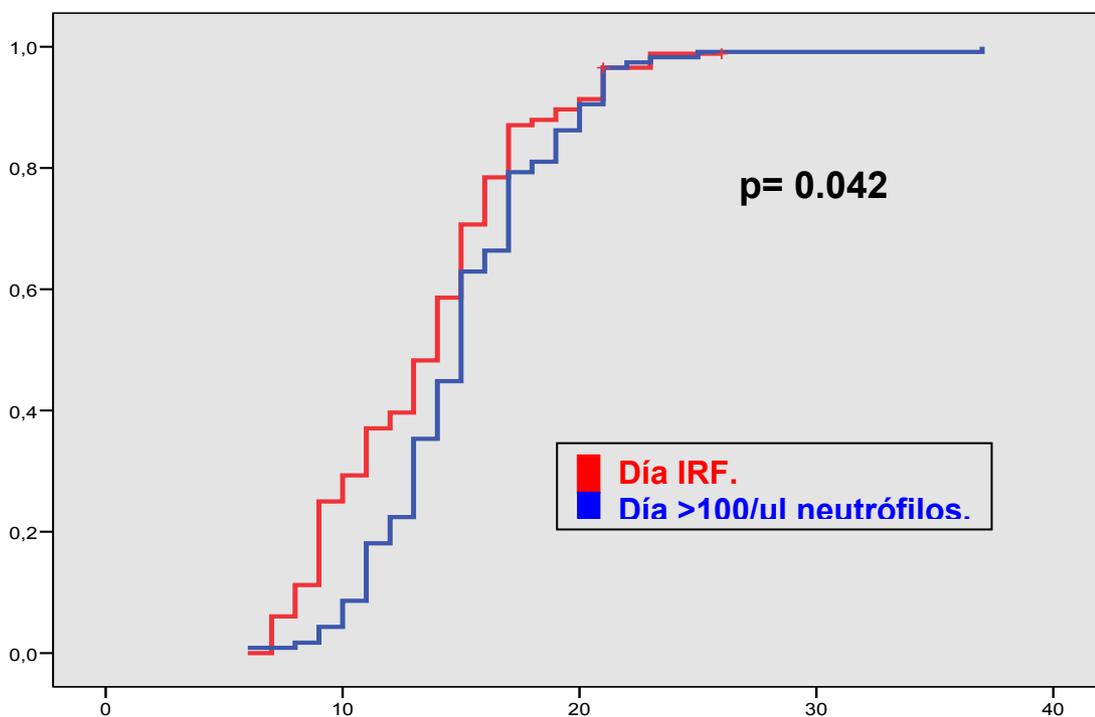


Figura 28.- IRF-Neutrófilos >100/μl: Emparentados HLA-idénticos.

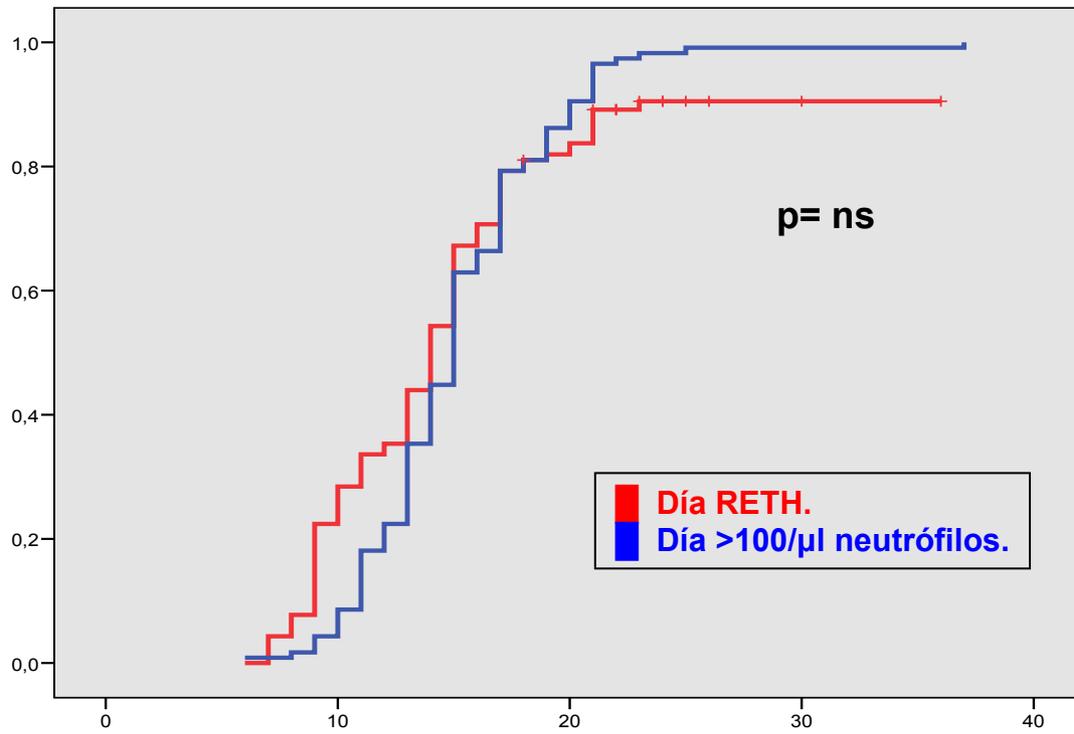


Figura 29.- RETH-Neutrófilos >100/μl: Emparentados HLA-idénticos.

Cuando, por otro lado, se estudian los pacientes que recibieron los progenitores de un donante no emparentado o bien de un donante emparentado HLA-no idéntico (n=90), también alcanzaron valores de MFI >10, IRF >10% y RETH>3%, antes que una cifra de neutrófilos >500/ μ l ($p < 0.001$, $p < 0.001$ y $p = 0.002$ para el MFI, IRF y RETH respectivamente). La mediana de MFI fue 13 días, la de IRF 14 días y la de RETH 14 días, mientras que la de >500/ μ l fue de 18,5 días. Para IRF, MFI y RETH comparado con >100 neutrófilos, no se alcanzó significación estadística.

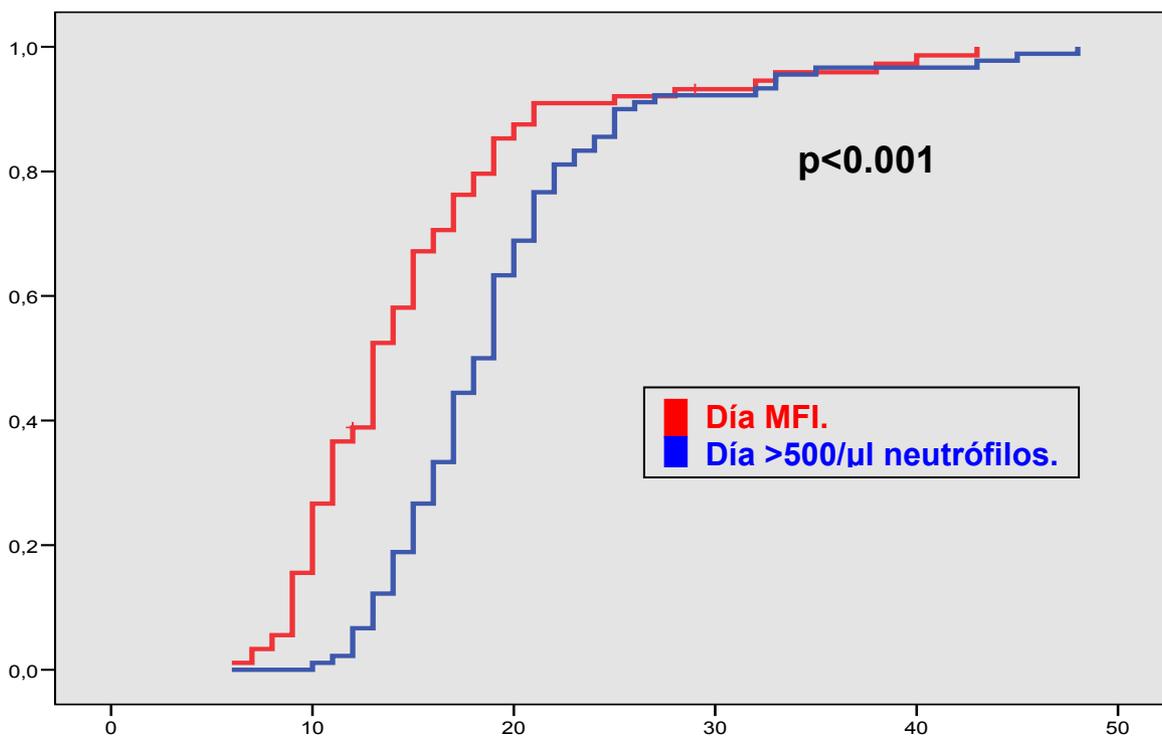


Figura 30.- MFI-Neutrófilos >500/ μ l: No Emparentado + HLA-no idénticos.

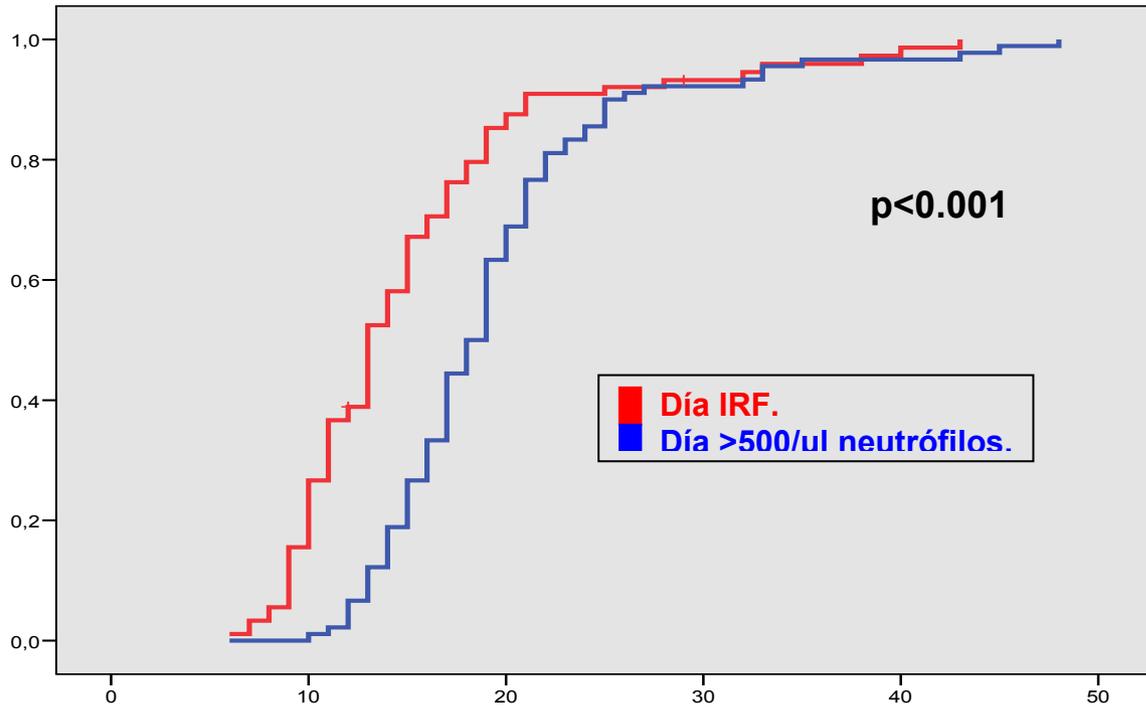


Figura 31.- IRF-Neutrófilos >500/ μ l: No Emparentado + HLA-no idénticos.

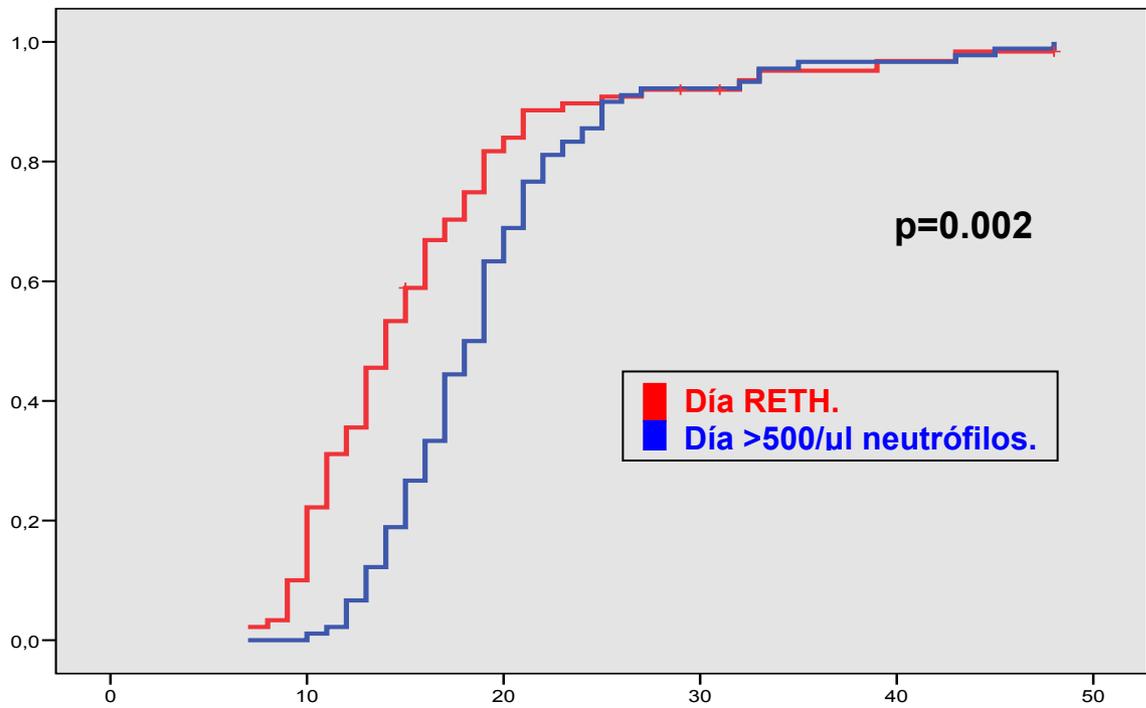


Figura 32.- RETH-Neutrófilos >500/ μ l: No Emparentado + HLA-no idénticos.

En el estudio univariante realizado para analizar los parámetros que influían en el prendimiento mieloide, se observa que el acondicionamiento ablativo respecto al no ablativo, el menor número de células CD34+, la edad adulta, la fuente de progenitores (cordón, médula y periférica) y el tipo de donante (no emparentado), retrasan el prendimiento mieloide. Manteniendo dos variables clínicas la significación en el multivariante; el acondicionamiento ablativo y la fuente de progenitores. ($p < 0.001$ y fuente ($p < 0.001$, $p < 0.001$ y $p = 0.142$).

Variables en la ecuación

	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
fuelle			21,193	2	,000	
Nombre de variable fuente(periferica)	,409	,278	2,159	1	,142	1,505
Nombre de variable fuente(cordon)	-,964	,233	17,067	1	,000	,381
ABLATIVO	-1,282	,322	15,863	1	,000	,278

Tabla 4.- Resultado del análisis multivariante en el que se estudian distintas variables clínicas que influyen en el prendimiento mieloide.

Analizamos todos los parámetros que pudiesen potencialmente predecir el prendimiento mieloide en los pacientes estudiados. En base a la regresión de Cox, $>100/\mu\text{l}$ neutrófilos ($p = 0.002$), $>100/\mu\text{l}$ monocitos ($p < 0.001$) y el IRF $\geq 10\%$ ($p = 0.009$) fueron predictores de prendimiento mieloide.

En un estudio realizado por Graziuti et al, en 2006, en pacientes sometidos a trasplante autólogo de progenitores hematopoyético, se establece otro parámetro reticulocitario con capacidad de adelantar el prendimiento mieloide, es el tiempo que tarde el IRF en doblar su valor mínimo (IRF-D), establecido como el primer día de dos consecutivos en los que el IRF doblaba el nadir previo. En este estudio este parámetro adelantaba en varios días la aparición en sangre periférica de $>100/\mu\text{l}$ neutrófilos. En nuestra serie este parámetro no puede ser establecido como tal, ya que en 114 (54.54%) pacientes

el nadir del IRF es 0. Para el resto de pacientes 95 (45.45%) el IRF-D ocurría significativamente antes que neutrófilos $>100/\mu\text{l}$ ($p=0.01$).

Pacientes (n)	MFI	IRF	RETH	100	500	1000	MONO
TODOS	13 (6-43)	14 (5-45)	14 (7-48)	15 (6-43)	17 (8-48)	19 (9-53)	15 (6-43)
EI	12 (6-26)	14 (5-26)	14 (7-36)	15 (6-37)	17 (8-39)	19 (9-39)	15 (7-37)
NO EMP	13 (6-43)	14 (7-45)	14 (7-48)	15 (6-43)	18.5 (10-48)	20 (11-53)	15 (6-43)
MEDULA	14 (7-40)	15 (7-40)	15 (7-48)	15 (6-43)	18 (12-43)	1 (13-45)	16 (6-43)
PERIFER.	9 (6-29)	9 (5-29)	9 (7-29)	12 (6-21)	14 (8-26)	15 (9-27)	12 (7-23)
CORDON	14.5 (10-43)	16 (9-45)	15.5 (9-43)	15 (10-37)	21 (15-48)	26 (17-53)	16.5 (7-43)

Tabla 5.- Tabla resumen con los días de prendimiento, expresados según la mediana (rango) de los distintos parámetros analizados.

MONO= Monocitos. EI= Emparentado HLA-idéntico. NO EMP= No emparentados+ emparentaos HLA-no idénticos. PERIF: Sangre preiférica.

F.2.- ANÁLISIS DE FACTORES CLÍNICOS QUE INFLUYEN EN EL PRENDIMIENTO ERITROIDE.

F.2.1.- ANÁLISIS UNIVARIANTE.

Según los resultados obtenidos en los análisis realizados, hemos identificado, de forma global, tres parámetros reticulocitarios (RETH, IRF, MFI) como predictores de prendimiento mieloide (neutrófilos > 500/μl). Hemos analizado a continuación diversos factores clínicos que pudiesen influir en el prendimiento reticulocitario, estudiando con antelación, la correlación que existe entre los tres parámetros en cuestión, observando la significación de todos ellos.

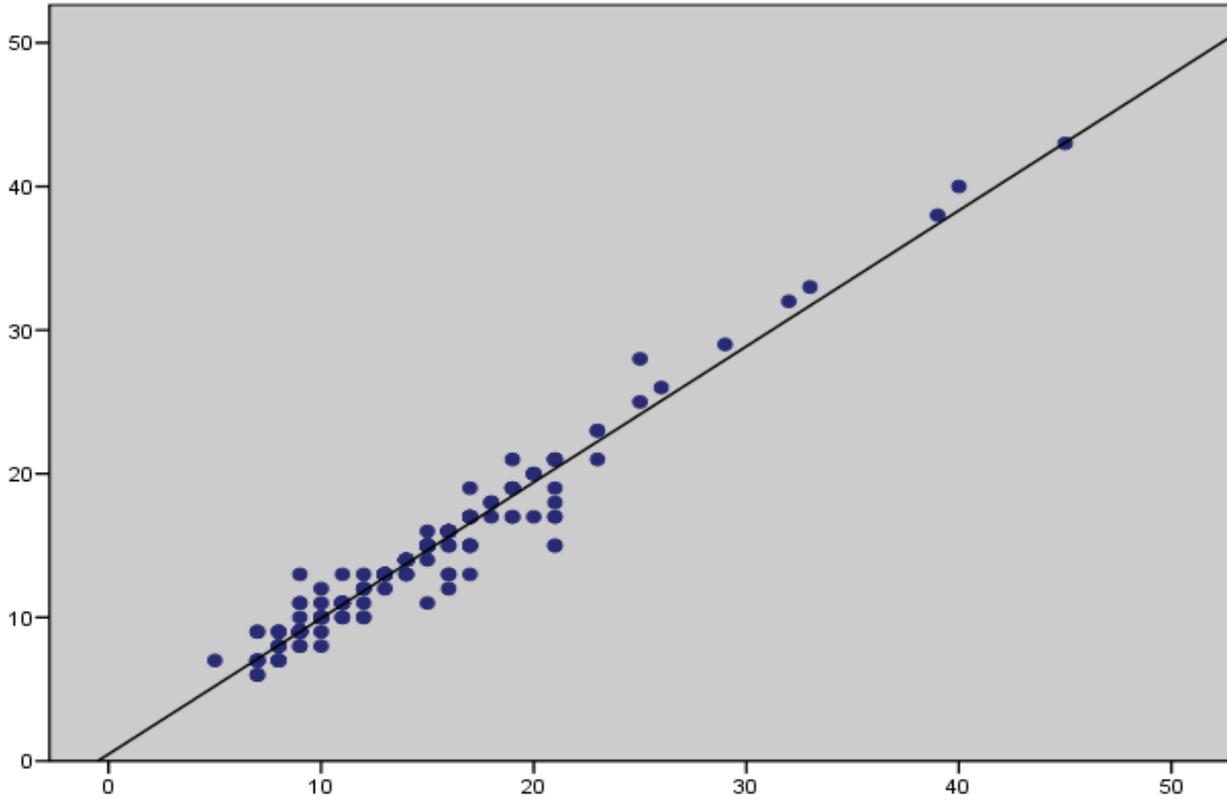
Hemos optado, una vez comprobada la correlación existente, por realizar los estudios estadísticos con el IRF, que es, desde el punto de vista clínico y analítico, el parámetro más interesante, ya que el MFI mide fluorescencia y el RETH sólo reticulocitos muy inmaduros y además en 15 pacientes no se ha alcanzado el punto de corte establecido del 3%, con lo que el retraso en la salida de dichos reticulocitos a sangre periférica puede distorsionar los resultados, siendo la suma de los reticulocitos de alta y media fluorescencia el parámetro clínico de más valor.

		MFI	IRF	RETH
diareth	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	,879(**) ,000 209	,884(**) ,000 209	1 209
diairf	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	,977(**) ,000 209	1 209	,884(**) ,000 209
diamfi	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	1 209	,977(**) ,000 209	,879(**) ,000 209

Correlaciones

Tabla 6.- Correlaciones entre los distintos parámetros reticulocitarios.

MFI



IRF

Model Summary and Parameter Estimates

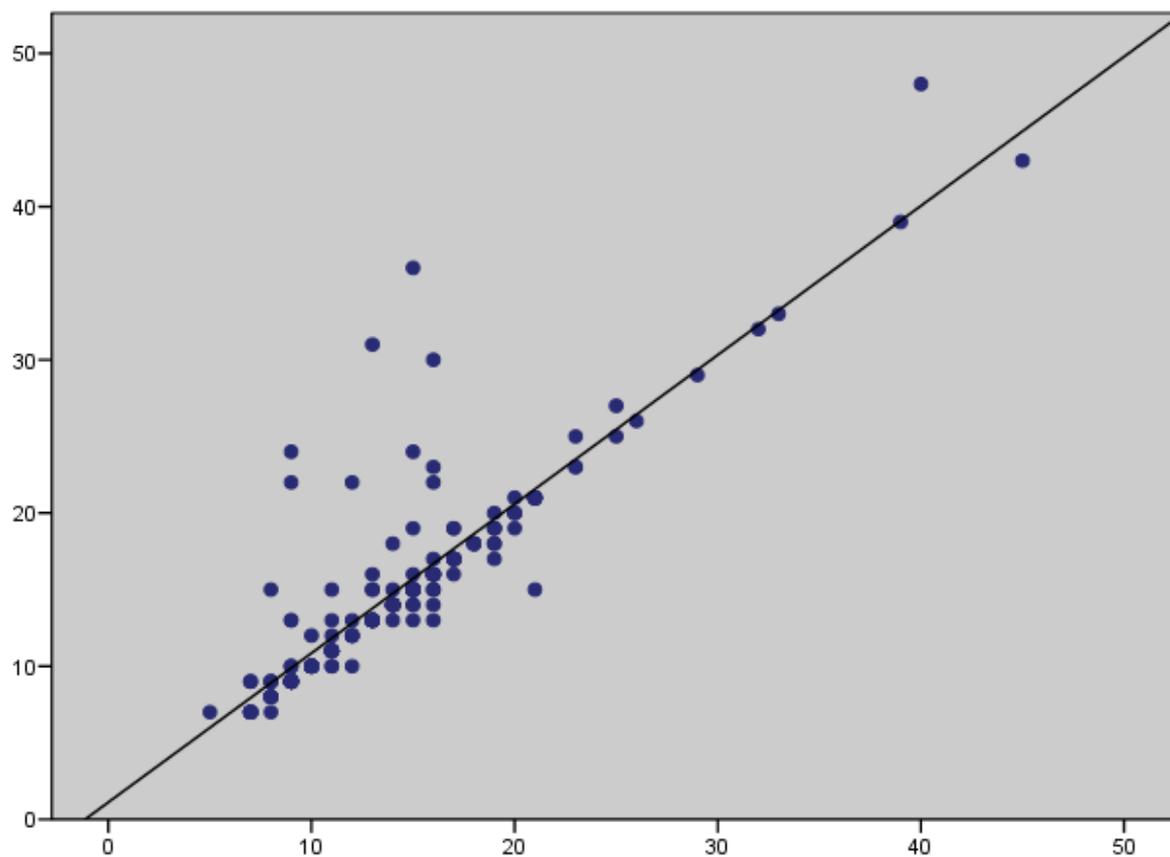
Variable dependiente: Día MFI

Equation	Model Summary					Parameter Estimates	
	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1
Linear	,955	4404,538	1	207	,000	,486	,946

La variable independiente es: Día IRF.

Figura 33: Correlación entre los parámetros MFI e IRF

RETH



IRF

Model Summary and Parameter Estimates

Variable dependiente: Día RETH

Equation	Model Summary					Parameter Estimates	
	R Square	F	df1	df2	Sig.	Constant	b1
Linear	,781	736,425	1	207	,000	1,123	,973

Variable independiente: Día IRF.

Figura 34: Correlación entre los parámetros RETH e IRF

FUENTE DE PROGENITORES

Tanto el prendimiento reticulocitario como el mieloide estaban fuertemente influenciados por la fuente de progenitores hematopoyéticos. La mediana de prendimiento está detallada en la tablas siguientes. Como se observa el prendimiento se produce sinificativamente antes si la fuente de progenitores es la sangre periférica, siendo más tardío si ésta es la sangre de cordón umbilical.

	Media	Mediana
Médula ósea	14,84	15
Sangre periférica	10,13	9
Cordón umbilical	18,14	16

	Médula	Periférica
Periférica	p=0,0001	
Cordón	p=0,049	p=0,0001

Tablas 7 y 8: Media y mediana del prendimiento eritroide (IRF) en base a la fuente de progenitores y relación estadística entre dichas fuentes.

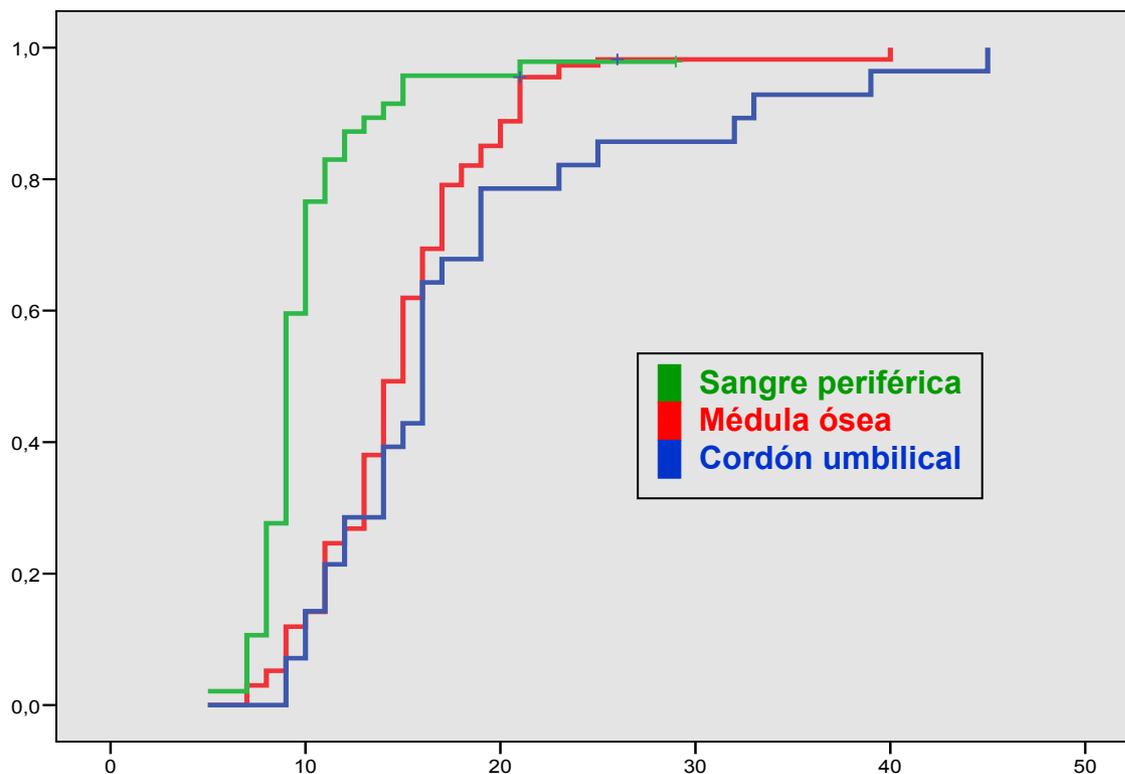


Figura 35.- Prendimiento eritroide según las distintas fuentes de progenitores utilizadas.

INCOMPATIBILIDAD AB0

Otra interesante variable a estudiar, era como podía afectar al prendimiento eritroide la compatibilidad-incompatibilidad de grupo entre el donante y el receptor. Se observó, que la presencia de incompatibilidad mayor o menor AB0 no tiene impacto en el prendimiento reticulocitario, según los parámetros estudiados, al compararlo con aquellos pacientes AB0 compatibles.

En este sentido, la mediana para alcanzar el IRF > 10%, ocurrió en el día +13 en los pacientes con incompatibilidad mayor AB0. Mientras que para aquellos AB0 compatibles la mediana fue también el día +13. Aquellos con incompatibilidad menor presentaron una mediana 13,5 días para dicho parámetro (sin significación estadística).

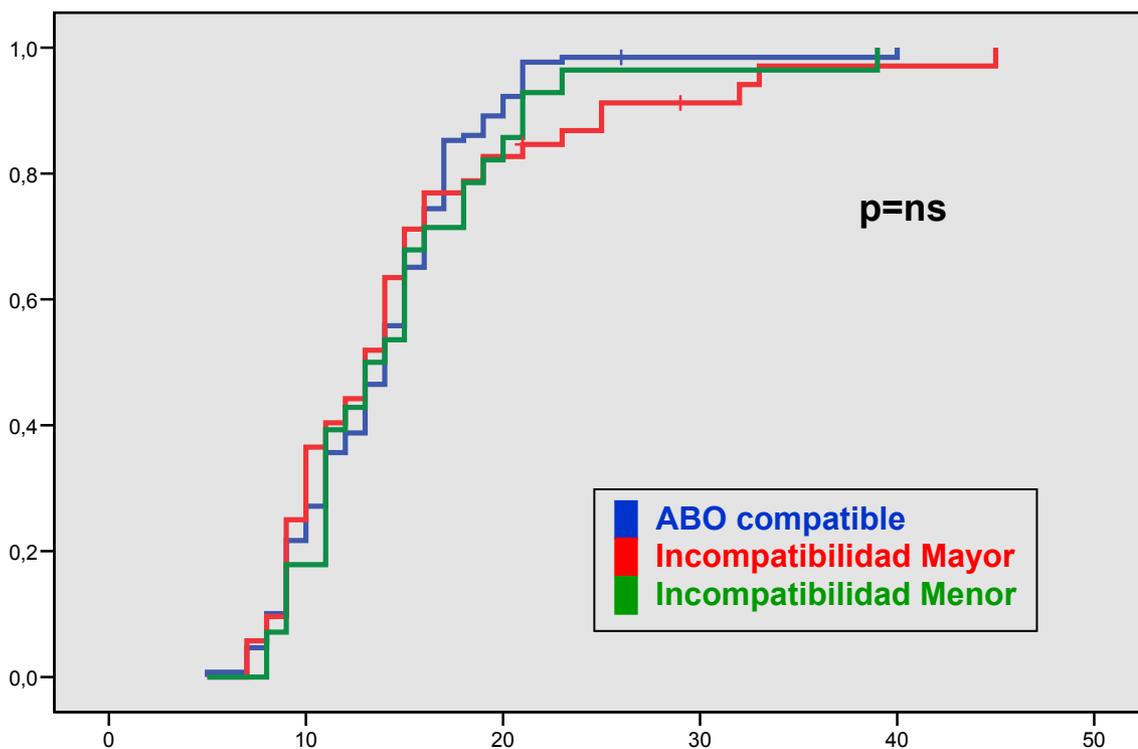


Figura 36.- Prendimiento eritroide según la compatibilidad AB0.

TIPO DE ACONDICIONAMIENTO

Otra de las variables estudiadas era el tipo de acondicionamiento recibido. Se comprobó, que aquellos individuos que recibían un Alo-TPH con acondicionamiento mieloablativo presentaban un prendimiento reticulocitario más tardío, cuando eran comparados con esos otros pacientes que reciben un Alo-TPH bajo acondicionamiento de intensidad reducida ($p=0.001$).

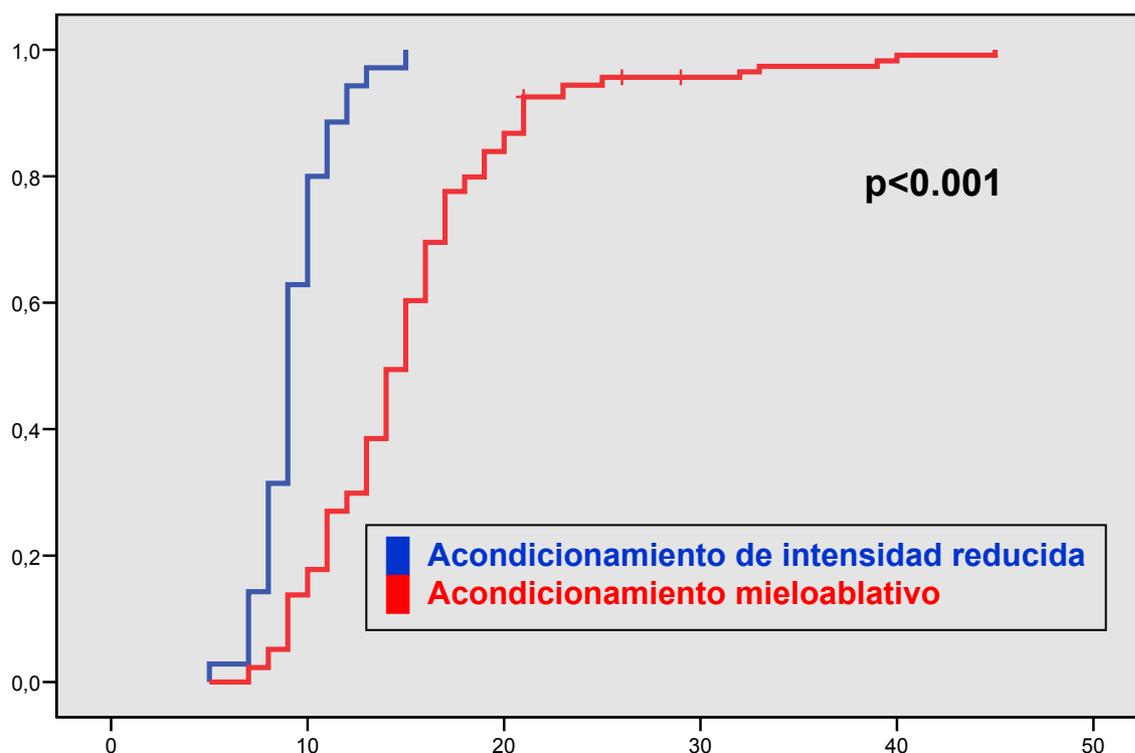


Figura 37.- Prendimiento eritroide según el tipo de acondicionamiento utilizado.

NÚMERO DE PROGENITORES INFUNDIDOS

El número de células CD34+ del injerto, es otra variable a destacar en el prendimiento eritroide. Para realizar este estudio, hemos calculado la mediana de

células CD34+/kg infundidas en el receptor, siendo la misma $3.1 \times 10^6/\text{kg}$. Se ha observado en este estudio, que el prendimiento eritroide, en base al IRF, ocurre significativamente antes si la infusión de células CD34+ es superior a $3.1 \times 10^6/\text{kg}$ ($p=0.0006$). Este parámetro también tiene significación en relación al prendimiento mieloide (neutrófilos $>500/\mu\text{l}$), que se alcanza con antelación en aquellos pacientes que presentan una infusión de células CD34+ superior a $3.1 \times 10^6/\text{Kg}$.

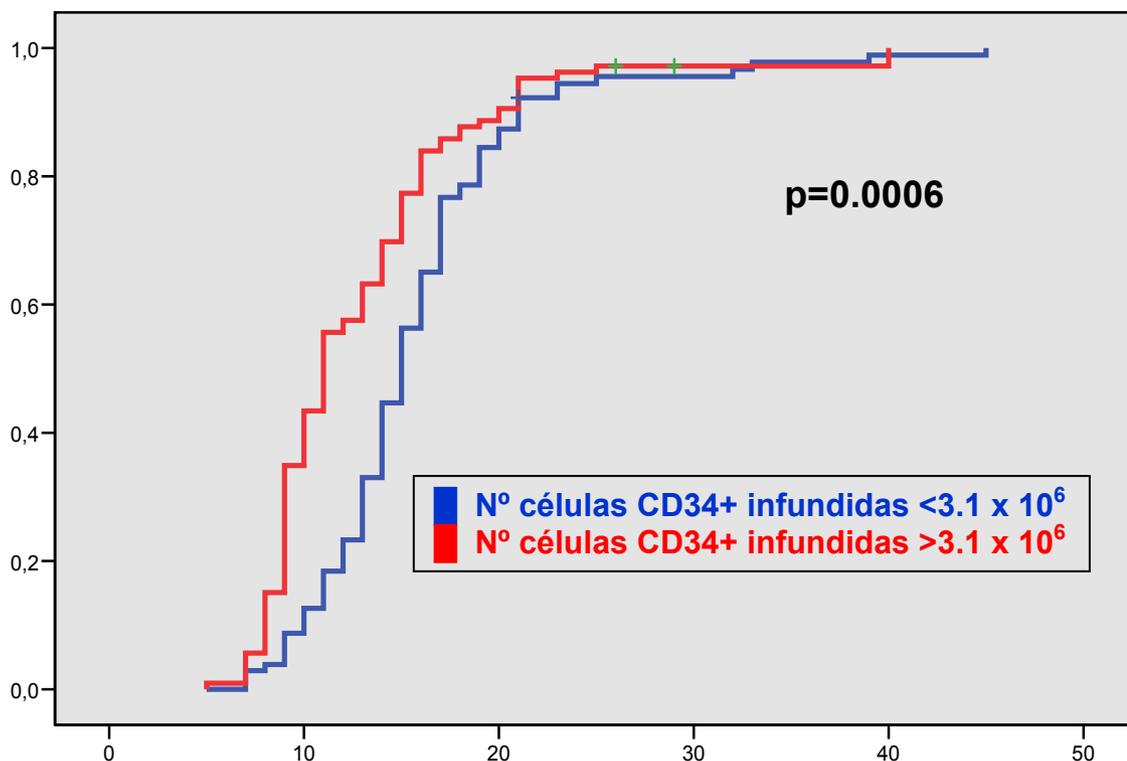


Figura 38.- Prendimiento eritroide según el número de células CD34+ infundidas.

EDAD AL TRASPLANTE

En este estudio, han participado pacientes adultos y en edad pediátrica, cuando se compara por edades, (<14 años= edad infantil, >14 años= edad adulta), se observa como el prendimiento reticulocitario se produce más precozmente en los pacientes adultos ($p=0.039$). Sin embargo, este resultado es debido al mayor porcentaje de pacientes adultos que han sido sometidos a un Alo-TPH con acondicionamiento de intensidad reducida, como se observa al estratificar por tipo de acondicionamiento (ablatoivo vs. intensidad reducida), perdiéndose esta significación. ($p=0.663$ para los de intensidad reducida y $p=0.226$ para los mieloablatoivos).

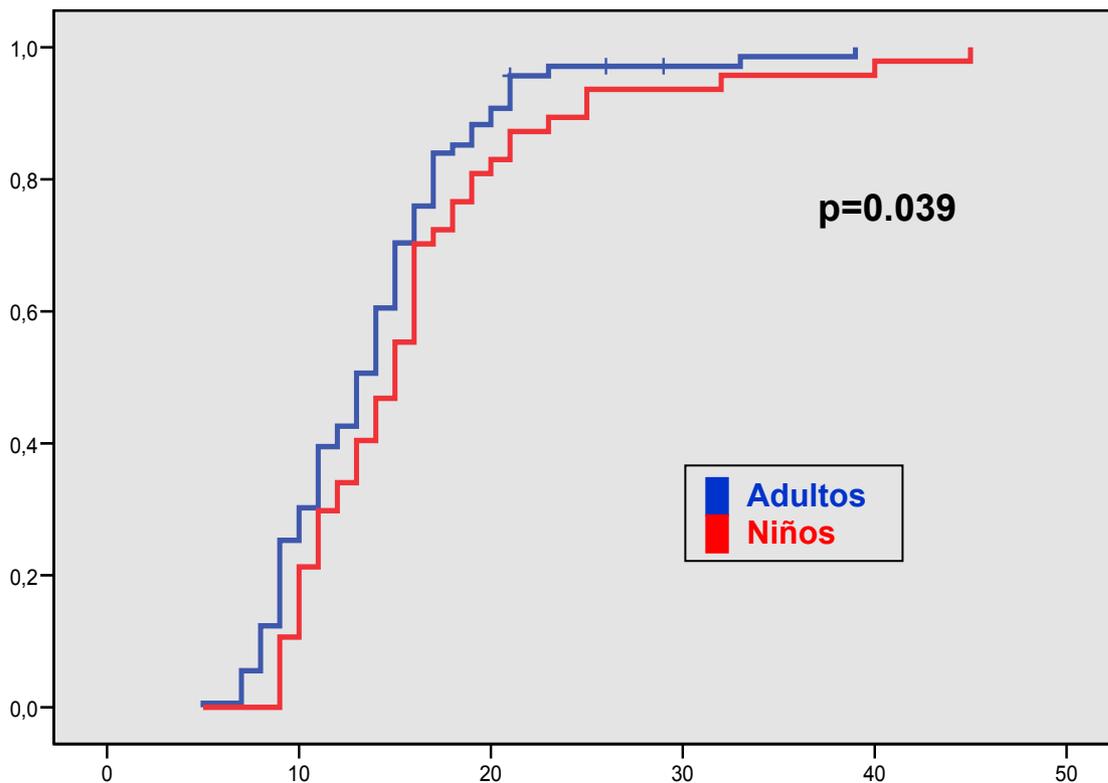
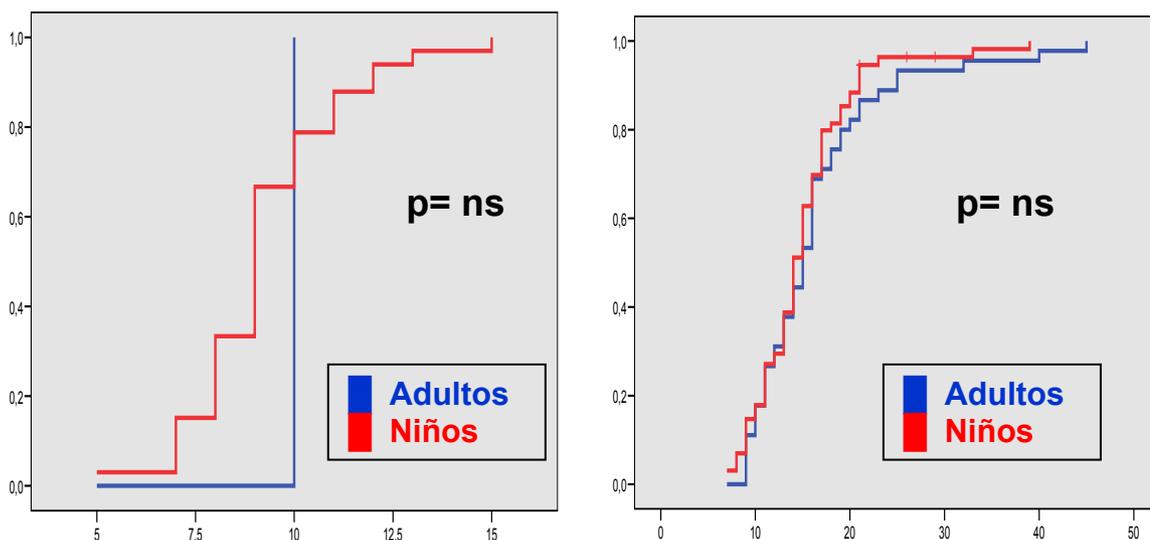


Figura 39.- Prendimiento eritroide según la edad de los pacientes.



Figuras 40 y 41.- Prendimiento eritroide según la edad de los pacientes. En la figura 40 aquellos que han recibido acondicionamiento de intensidad reducida y en la 41 los que han recibido un acondicionamiento mieloablativo.

TIPO DE DONANTE

También existen diferencias estadísticas en el prendimiento eritroide al comparar a aquellos pacientes que reciben un injerto de un familiar HLA-ídéntico y aquellos que lo hacen, bien de un familiar HLA-no idéntico o de un donante no emparentado ya sea HLA idéntico o no. En el primer grupo, el prendimiento se produce más precozmente que en el segundo ($p=0.035$)

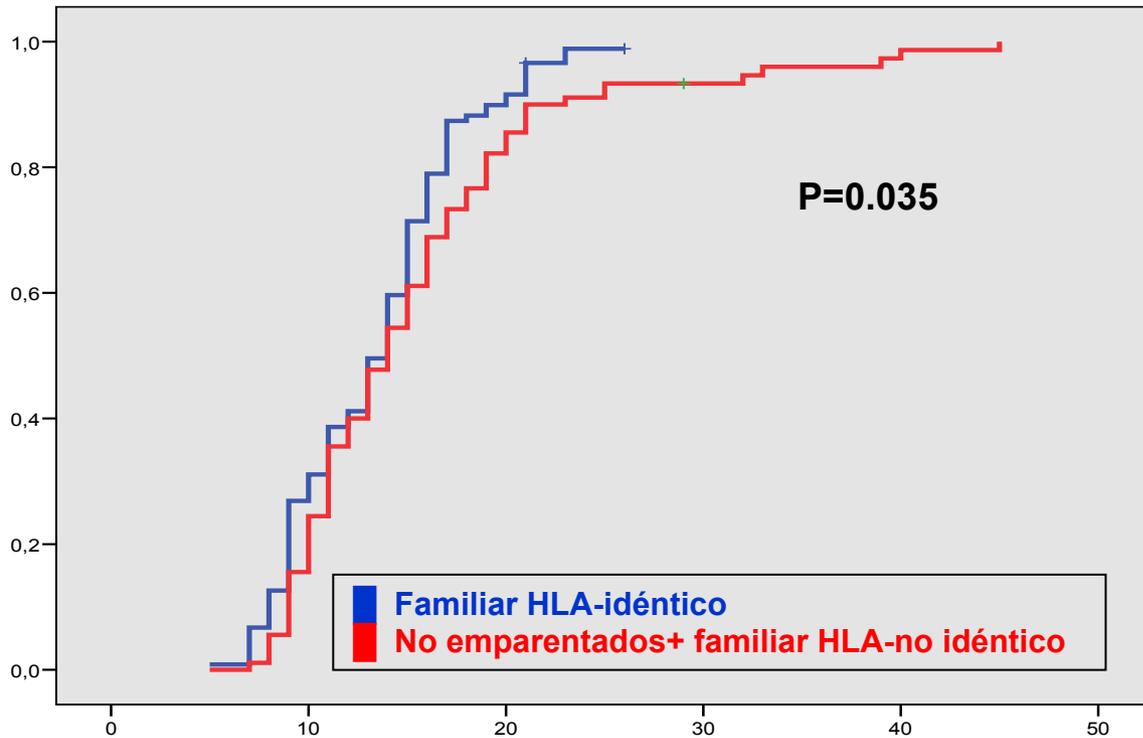


Figura 42.- Prendimiento eritroide según la relación de parentesco y compatibilidad HLA existente entre el donante y el receptor.

OTRAS VARIABLES

Otras variables clínicas como recibir radioterapia en el acondicionamiento, sexo del receptor, estado de la enfermedad en el momento del procedimiento (primera remisión completa vs. no primer remisión), tipo de profilaxis de la Enfermedad del Injerto contra el Huésped (MTX vs. no MTX), presencia de EICH agudo, haber padecido un episodio febril durante la neutropenia o tener un hemocultivo positivo a algún microorganismo durante el proceso, no mostraron significación estadística en cuanto al prendimiento reticulocitario. Estos datos del estudio univariante están resumidos en la siguiente tabla.

Variable clínica	IRF (valor de p)
Radioterapia en el acondicionamiento	0,3779
Sexo del receptor	0,276
Estado de la enfermedad	0,749
MTX en profilaxis de la EICH	0,053
Presencia de EICH	0,9381
Hemocultivos positivos	0,3382
Fiebre	0,7439

Tabla 9.- Variables clínicas sin significación estadística en relación al prendimiento eritroide (IRF).

F.2.2.- ANÁLISIS MULTIVARIANTE

En el estudio multivariante mediante regresión de Cox, se incluyendo diversas variables clínicas que podían influir en el prendimiento eritroide, para la realización de dicho estudio, se eliminaron de la serie inicial de 225 pacientes, un total de 16 que son aquellos que fallecieron sin alcanzar prendimiento eritroide ni mieloide o bien sufrieron un fallo primario del injerto.

PACIENTE Y MÉTODOS: 209 pacientes sometidos a Alo-TPH, de los cuales alcanzan el prendimiento reticulocitario, medido por el IRF, 98.56% (206), siendo el resto censurados.

Se consideró como variable dependiente a la variable IRF (días). Las variables independientes fueron aquellas que en el univariante tuvieron una $p < 0.25$: edad (0: infantil; 1: adulto), fuente de progenitores (0: médula ósea; 1: sangre periférica; 2: cordón umbilical), acondicionamiento ablativo (0: ablativo; 1: no ablativo), MTX en la profilaxis del EICH (0: no; 1: si) y número de células CD34+ infundidas (0: $< 3.1 \times 10^6/\text{kg}$; 1: $> 3.1 \times 10^6/\text{kg}$). Dichas variables se utilizaron en el modelo de regresión de COX; por medio del estadístico de Wald, las variables con $p > 0.15$ (procedimiento de selección metódica) fueron eliminadas una a una del modelo, la comparación del modelo reducido con el modelo que incluye las variables eliminadas se realizó mediante el test de la razón de verosimilitud. La escala de las variables continuas, valorada mediante la prueba de Box-Tidwell, no fue necesario realizarla al no existir ninguna variable de este tipo. Se estudiaron las posibles interacciones entre las variables. Como prueba diagnóstica de casos extremos se utilizaron los valores $df\beta$. La representación gráfica de los residuos de martingala y de los residuos parciales, se empleó para valorar la bondad de ajuste.

Las variables edad, MTX, tipo de donante y número de células CD34+ infundidas, fueron eliminadas del modelo (Test de la razón de verosimilitud, $G = 1,254$; $GL: 4$; $p = 0.869 = \text{NS.}$)

Al no permanecer ninguna variable continua no fue necesario estudiar linealidad. Se valoraron las posibles interacciones siendo no significativas. Ninguna variable de las que permanecieron en el modelo era factor de confusión. Los paciente 3 y 131 fueron considerados como datos extremos, aunque no se eliminaron del modelo.

Variables en la ecuación

	B	ET	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
							Inferior	Superior
Fuente			5,847	2	,054			
Nombre de variable Fuente(1)	,433	,274	2,502	1	,114	1,541	,902	2,635
Nombre de variable Fuente(2)	-,354	,218	2,640	1	,104	,702	,458	1,076
ABLATIVO	-1,311	,315	17,272	1	,000	,270	,145	,500

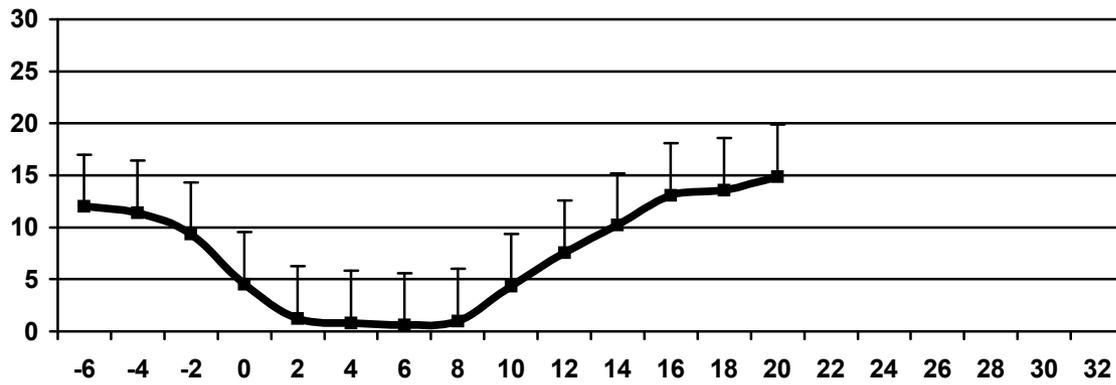
VARIABLE	COEFICIENTE	ERROR STANDAR	P	RR	IC 95%
MÉDULA			0,54		
PERIFÉRICA	0,433	0,273	0,114	1,541	0,92-2,63
CORDON	-0,354	0,218	0,104	0,720	0,45-1,07
ABLATIVO	-1,311	0,315	0,000	0,270	0,14-0,50

G= 58,769 GL: 3 p= 0.000

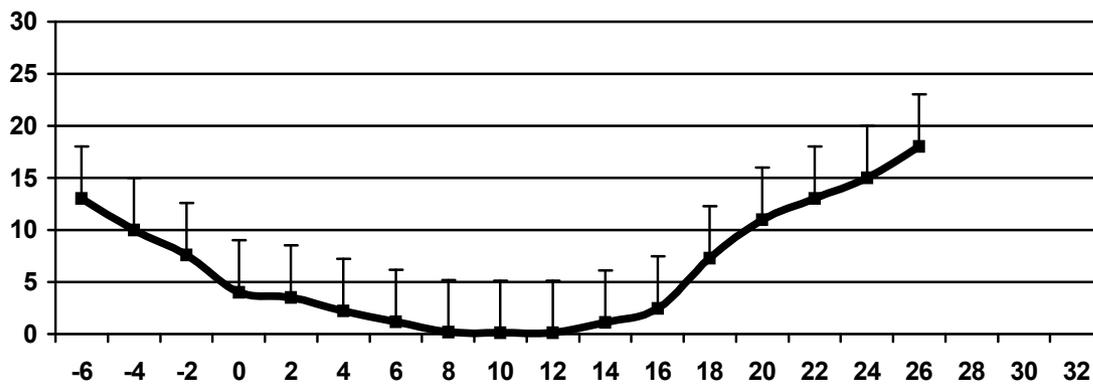
Tablas 10 y 11.- Resultados finales del análisis multivariante en el que se observa la influencia de determinadas variables clínicas en el prendimiento eritroide (IRF).

F.3.- CINÉTICA DE LA FRACCIÓN RETICULOCITARIA INMADURA (IRF) SEGÚN LA FUENTE DE PROGENITORES.

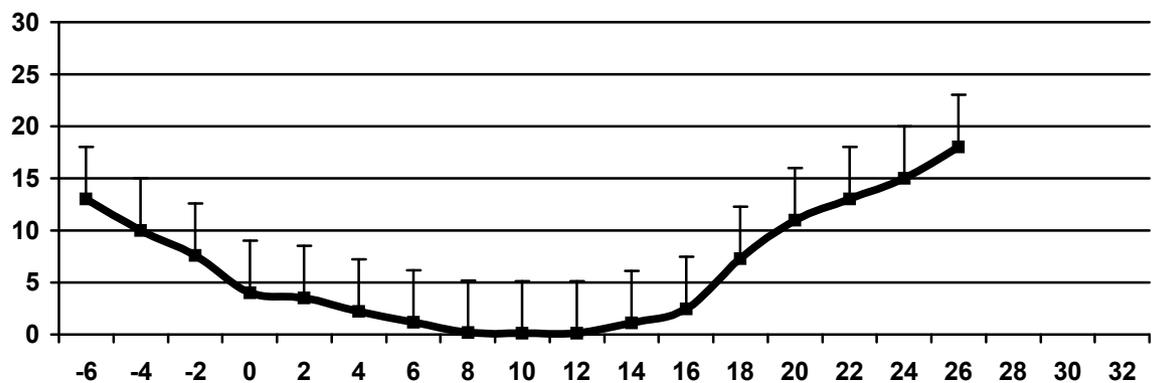
En base al IRF, se observan las diferencias temporales del prendimiento según las distintas fuentes de las que se han obtenido los progenitores. En el eje de la x se representa los días anteriores (en negativo) y posteriores a la infusión de los progenitores, mientras que en el eje y se representa la media del IRF, considerando prendimiento cuando alcanza el 10%.



Médula ósea



Sangre periférica



Cordón umbilical

Figuras 43, 44 y 45.- Prendimiento eritroide basado en el IRF según las distintas fuentes de progenitores utilizadas.

F.4.- ANTELACIÓN EN BASE A LOS PARÁMETROS DE MADURACIÓN RETICULOCITARIA DEL PRENDIMIENTO MIELOIDE.

Probablemente, el dato de mayor importancia, son los días de antelación con los que, en base a los parámetros reticulocitarios, podemos predecir el futuro prendimiento mieloide. Según los resultados de este estudio, el prendimiento eritroide, basado en el IRF, es capaz de adelantar en varios días el prendimiento mieloide, concretamente en 4 días (mediana) y 4,076 días (media). También los otros parámetros reticulocitarios nos adelantan en varios días el prendimiento, el MFI en 4 días (mediana) y 4.35 días (media) y el RETH en 3 días (mediana) y 3,33 días (media).

	MEDIA	MEDIANA
IRF	4.07	4
MFI	4.35	4
RETH	3.33	3

Tabla 12.- Media y mediana para cada parámetro reticulocitario de los días con los nos adelanta el prendimiento mieloide (neutrófilos >500/ μ l).

Para estudiar la influencia que determinadas variables clínicas pueden tener sobre dicha diferencia de días, hemos utilizado el test t student para comparación de medias de muestras independientes.

De esta forma, se aprecia como el tipo de fuente, la utilización de MTX en la profilaxis del EICH, la radioterapia en el acondicionamiento o el número de

células CD34+ infundidas influyen en la diferencia temporal con la que los parámetros reticulocitarios predicen el prendimiento mieloide.

FUENTE DE PROGENITORES

Al analizar aquellos que reciben el injerto procedente de sangre periférica comparado con los que lo hacen de cordón, también existe significación (media sangre periférica= 4.14 días, media cordón= 6,57 días, $p=0.031$). Esta significación también se objetiva con los otros dos parámetros reticulocitarios estudiados, MFI y RETH. No existe, sin embargo, significación al comparar médula ósea con sangre periférica. Estos resultados se muestran a continuación, entre paréntesis se define el rango:

	Médula	Periférica	p
IRF	3,52 (-2-13)	4,14 (0-8)	0,258
MFI	3,84 (-2-13)	4,21 (-2-8)	0,49
RETH	2,52 (-1-12)	3,55 (-2-8)	0,174

	Médula	Cordón	p
IRF	3,52 (-2-13)	6,57 (0-19)	<0,001
MFI	3,84 (-2-13)	7,03 (0-22)	<0,001
RETH	2,52 (-1-12)	6,78 (0-18)	<0,001

	Periférica	Cordón	p
IRF	4,14 (0-8)	6,57 (0-19)	0,031
MFI	4,21 (-2-8)	7,03 (0-22)	0,009
RETH	3,55 (-2-8)	6,78 (0-18)	0,007

Tablas 13, 14 y 15.- Media de los días de antelación con los que los parámetros reticulocitarios adelantan el prendimiento mieloide, según la fuente de obtención de los progenitores.

Cuando se analizan los pacientes según el tipo de acondicionamiento (ablatoivo vs intensidad reducida) se observa que no existen diferencias significativas, aunque existe tendencia por la que en los pacientes con acondicionamiento de intensidad reducida el tiempo con el que los parámetros reticulocitarios predicen el prendimiento mieloide es mayor.

	Ablativo	Intensidad reducida	p
IRF	4,02 (0-19)	4,34 (1-8)	0,478
MFI	4,35 (-2-22)	4,34 (1-8)	0,976
RETH	3,25 (-2-18)	3,71 (1-8)	0,493

Tabla 16.- Media de los días de antelación con los que los parámetros reticulocitarios adelantan el prendimiento mieloide, según el tipo de acondicionamiento utilizado.

Si comparamos a los pacientes que reciben los progenitores de médula ósea con esos otros que los reciben de sangre periférica, pero únicamente los que reciben un acondicionamiento ablatoivo, observamos que las diferencias existentes son menores.

Acond. ablatoivo	Médula	Periférica	p
IRF	3,53 (-2-13)	3,41 (0-5)	0,960
MFI	3,84 (-2-13)	3,66 (-2-8)	0,948
RETH	2,52 (-1-12)	2,83 (-2-8)	0,677

Tabla 17.- Media de los días de antelación con los que los parámetros reticulocitarios adelantan el prendimiento mieloide en los pacientes que reciben un acondicionamiento ablatoivo, según la fuente de progenitores (médula vs. sangre periférica).

Cuando un paciente recibe metotrexate como parte de la profilaxis de la EICH, se observa que la diferencia con la que se alcanza el punto de corte establecido para los parámetros reticulocitarios en relación al prendimiento mieloide, es mayor en aquellos pacientes que no han recibido metotrexate como parte de la profilaxis del EICH. Esta significación mantiene la tendencia cuando se estratifica por la fuente de progenitores, no alcanzando significación, probablemente, por la diferencia de n existente en cada uno de los grupos comparados.

	MTX	No MTX	p
IRF	3,49 (-2-13)	5,39 (0-19)	0,001
MFI	3,80 (-2-13)	5,60 (0-22)	0,001
RETH	2,58 (-2-12)	5,01 (0-18)	0,001

	Médula	Periférica	Cordón
MTX (IRF)	3,46	3,58	4,66
No MTX (IRF)	5,75	4,34	6,80
p	0,165	0,649	0,594

Tablas 18 y 19.- Media de los días de antelación con los que los parámetros reticulocitarios adelantan el prendimiento mieloide, según se reciba metotrexate como profilaxis del EICH, y mismo estudio (unicamente con el IRF), pero estratificado según la fuente de obtención de los progenitores.

También existen diferencias cuando analizamos aquellos pacientes que reciben radioterapia en el acondicionamiento. Se observa que aquellos que no la reciben presentan más diferencia temporal entre el prendimiento eritroide y el mieloide que aquellos otros que la reciben como parte del acondicionamiento, alcanzándose significación estadística.

	Radioterapia	No Radioterapia	p
IRF	3,47 (-2-13)	4,88 (0-19)	0,016
MFI	3,80 (-2-12)	5,08 (0-22)	0,009
RETH	2,49 (-2-12)	4,46 (0-18)	0,004

Tabla 20.- Media de los días de antelación con los que los parámetros reticulocitrios adelantan el prendimiento mieloide, según se reciba radioterapia en el acondicionamiento.

Si eliminamos de este estudio a aquellos pacientes que reciben los progenitores de sangre de cordón umbilical -ninguno de ellos recibió RT en el acondicionamiento-, observamos que la tendencia se mantiene.

	Radioterapia	No Radioterapia	p
IRF	3,52 (-2-13)	4,00 (0-13)	0,346
MFI	3,86 (-2-12)	4,07 (0-12)	0,663
RETH	2,52 (-2-12)	3,30 (0-12)	0,263

Tabla 21.- Media de los días de antelación con los que los parámetros reticulocitrios adelantan el prendimiento mieloide, según se reciba radioterapia en el acondicionamiento, no incluyéndose en el estudio los que reciben los progenitores de sangre de cordón umbilical.

Existen, asimismo, diferencias cuando analizamos aquellos pacientes que reciben en el injerto una cantidad de células CD34+ superior a la mediana del estudio ($3.1 \times 10^6/\text{kg}$), en ellos la diferencia temporal con la que los parámetros reticulocitarios predicen del prendimiento mieloide es mayor cuanto menos cantidad de células CD34+ se infunden en el paciente, siendo estadísticamente significativo con respecto al MFI.

	<3.1x10⁶/kg CD34+	>3.1x10⁶/kg CD34+	p
IRF	4,47 (-2-19)	3,68 (-2-13)	0,145
MFI	4,91 (-2-22)	3,81 (-2-13)	0,037
RETH	2,84 (-2-18)	3,82 (-2-13)	0,148

Tabla 22.- Media de los días de antelación con los que los parámetros reticulocitrios adelantan el prendimiento mieloide, según el número de progenitores infundidos.

Se observa que cuando existe incompatibilidad mayor ABO, el prendimiento eritroide adelanta en 3,94-3,71-2,66 (MFI, IRF, RETH) días de media al mieloide y 4-4-3 de mediana. Cuando existe incompatibilidad menor lo adelanta en 3,36, 3,53, 2,12 (MFI, IRF, RETH) días de media y 3-3.5-3 de mediana, mientras que cuando existe compatibilidad ABO lo hace en 4,69, 4,35, y 3,7 (MFI, IRF, RETH) días de media y 4-4-4 de mediana, sin significación estadística.

A continuación se presentan los valores de p al analizar otras variables clínicas que forman parte del estudio:

Valor de p	MFI	IRF	RETH
Sexo	0,124	0,035	0,364
Edad	0,504	0,953	0,774
Estado enfermedad	0,910	0,576	0,720
Fiebre	0,716	0,571	0,577
Hemocultivos +	0,616	0,634	0,119
EICH	0,356	0,522	0,063
Tipo de donante	0,579	0,883	0,419

Tabla 23.- Valores de p al analizar la influencia de dichas variables en relacion a los días (media) con los que los distintos parámetros reticulocitarios nos adelantan el prendimiento mieloide.

F.5.- PARÁMETROS DE MADURACIÓN RETICULOCITARIOS EN PACIENTES CON FALLO DEL INJERTO.

Cuando estudiamos solamente los pacientes que alcanzaron satisfactoriamente el prendimiento con una hematopoyesis derivada del donante, es decir no incluyendo a aquellos que fallecieron antes de alcanzarlo o presentaron fallo primario del injerto, se observa que la cifra de $>500/\mu\text{l}$ neutrófilos se alcanzó antes del día +26 en el 95,7% de los casos -de los 9 que no lo alcanzaron, 8 recibieron los progenitores de sangre de cordón y 1 de médula ósea-, mientras que el MFI >10 se alcanzó en el día +23 en el 96.18% de los casos -de los 8 pacientes que no lo alcanzaron, en 5 los progenitores se obtuvieron de cordón, en 2 de médula y en 1 de sangre periférica-, y el IRF $>10\%$ en el 95.7% de los pacientes -de los 9 casos que no lo alcanzaron, en 5 los progenitores se obtuvieron de sangre de cordón, en 3 de médula y en 1 de sangre periférica-.

Además, aquellos pacientes que no alcanzaron dicho valor de IRF en el día +23 están predispuestos a presentar fallo del injerto. Si estudiamos estos datos en base a la fuente de obtención de los progenitores observamos que el 90% de los que reciben el injerto procedente de médula ósea alcanzan el IRF $>10\%$ el día +22 -siendo el 23.07% de los que no lo hacen (3/13) fallos del injerto, 3 primarios-, mientras que el 90% de aquellos que los reciben de sangre periférica lo alcanzan antes del día +20 -el 80% (4/5) de los que no alcanzan el punto de corte para el IRF son 3 casos de fallos primarios del injerto y 1 de fallo secundario- y para el 90% de los pacientes que reciben los progenitores de sangre de cordón umbilical el IRF alcanza los puntos de corte en el día +33 -siendo el 50% de los que no lo hacen (2/4) fallos primario del injerto-.

Como ya se ha comentado, en nuestra serie, 11 pacientes, que suponen el 4.88% han presentado fallo del injerto, 8 primario (3.55%) y 3 secundario (1.33%).

Los datos clínicos de estos pacientes están recogidos en la tabla que aparece al final de este apartado. En sólo un caso de fallo primario del injerto los parámetros de maduración reticulocitarios (MFI, IRF, RTEH) alcanzaron los puntos de corte establecidos pero sin mantenerlos en el tiempo más de 4 días consecutivos. En el resto de pacientes con fallo primario del injerto no existió ningún signo de prendimiento eritrocitario en base a los parámetros de maduración reticulocitarios. En uno de los tres pacientes que presentaron fallo secundario del injerto, ni el MFI ni el IRF alcanzaron los valores establecidos como puntos de corte (>10 y $>10\%$, respectivamente). Se realizó una infusión de nuevos progenitores hematopoyéticos de rescate en 8 pacientes, la procedencia de los mismos era alogénica en 6 casos y en los 2 restantes autóloga, con restauración hematopoyética satisfactoria en 4 casos, que se presentan, más detalladamente, a continuación.

El primero de ellos fue una mujer de 42 años diagnosticada de leucemia mieloide crónica, que recibió un Alo-TPH con progenitores procedentes de médula ósea de un donante no emparentado HLA idéntico. Recibió una infusión de $2.5 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+, tras haber sido acondicionada con irradiación total hiperfraccionada y ciclofosfamida y recibiendo como profilaxis de EICH ciclosporina y metotrexate en pauta corta. La paciente presentó un incremento en valores de los parámetros de maduración reticulocitaria sin alcanzar los puntos de corte establecidos en el día +14 y mantenido durante 3 días, en el día +17 alcanzó unas cifras de neutrófilos de $230/\mu\text{l}$. Posteriormente a partir de este día no consiguió mantener los valores de los parámetros reticulocitarios descendiendo los neutrófilos a cifras inferiores a $10/\mu\text{l}$. Recibió un injerto autólogo de progenitores, con 1.37×10^7 células mononucleares/kg, en el día +33 con prendimiento hematopoyético y resolución del cuadro febril.

El segundo paciente fue una niña de 16 meses de edad diagnosticada de leucemia linfoblástica aguda. Fue sometida a un Alo-TPH con progenitores procedentes de médula ósea de un donante no emparentado HLA-idéntico, recibiendo una infusión con $3.15 \times 10^6/\text{Kg}$ células CD34+. Acondicionada con

busulfan+ciclofosfamida+etopóxido, recibió profilaxis de EICH con ciclosporina y metotrexate en pauta corta. En el día +18 MFI, RETH e IRF alcanzaron sus puntos de corte mientras que las cifras de neutrófilos superaron los 500/ μ l en el día +23. Dos días después (+25) los neutrófilos descendieron progresivamente hasta niveles indetectables, al igual que los parámetros reticulocitarios. Ante la presencia de fallo secundario del injerto, en el día +49 recibió una segunda infusión procedente del mismo donante (3.15×10^6 /kg CD34+) tras la administración de globulina antitimocítica y ciclofosfamida, con recuperación hematopoyética derivada del donante, alcanzando el prendimiento mieloide en el día +21 tras esta segunda infusión, detectándose 3 días antes de ese jornada el prendimiento eritroide en base a los parámetros de maduración reticulocitarios.

El tercer caso es un paciente varón de 46 años de edad que había sido sometido previamente en el año 2002 a un Alo-TPH con progenitores obtenidos de médula de donante emparentado HLA-idéntico por Leucemia Mieloide Crónica. Posteriormente presentó recaída de su patología de base, siendo tratado con infusiones de linfocitos del donante e imatinib mesilato. En Diciembre de 2007 se detecta la aparición de un Síndrome Mielodisplásico (Anemia Refractaria con Exceso de Blastos tipo I), por lo que se realiza un Alo-TPH con progenitores procedentes de sangre periférica de donante emparentado HLA-idéntico en un número de 7.84×10^6 /kg, recibe acondicionamiento no mieloablativo con fludarabina y busulfan y la profilaxis de EICH la realiza con ciclosporina y mofetil micofenolato. En el día +21 el MFI, RETH y IRF superan los puntos de corte establecidos durante dos días, cayendo posteriormente por debajo de los mismos no volviendo a superarlos, excepto el día +30 de forma aislada. Los recuentos de neutrófilos y monocitos se mantuvieron siempre por debajo de 100/ μ L. En el día +34 se infunden de nuevo 6.52×10^6 /kg células CD34+ procedentes de sangre periférica del mismo donante tras acondicionamiento con fludarabina, en el día +7 el RETH y el IRF superan los puntos de corte y en el día +9 lo hace el MFI. Posteriormente, en el día +12, presenta por vez primera >500 / μ L neutrófilos en sangre periférica, confirmándose el prendimiento mediante técnicas de biología

molecular que muestran la presencia de un quimerismo completo a expensas del donante.

El cuarto caso se trata de una paciente de 4 años de edad sometida a un Alo-TPH por Leucemia Mieloblástica Aguda con progenitores procedentes de sangre de cordón umbilical de un paciente HLA-idéntico, infundiéndose un total de $0.24 \times 10^6/\text{kg}$ células CD34+, tras ser acondicionada con thiotepa+fludarabina+busulfan+ATG y recibir ciclosporina y mofetil micofenolato como profilaxis de la EICH. En el día +31 presenta quimera mixta del 29.7% en médula ósea y en el día +44 se detecta prendimiento eritropoyético en base al MFI, RETH e IRF, pero mantenidos durante 2 días consecutivos en niveles levemente superiores a los puntos de corte establecidos. En el día +49 se alcanza el recuento más alto de neutrófilos, $220/\mu\text{L}$ en sangre periférica descendiendo al día siguiente a cifras inferiores a $50/\mu\text{L}$. En ningún momento los monocitos han superado los $100/\mu\text{L}$. Ya en el día +47 los parámetros reticulocitarios están por debajo de sus puntos de corte, encontrándose la paciente en quimera mixta del 80% en médula ósea, por lo que se decide rescate con progenitores autólogos que se infunden el día +56, produciéndose prendimiento hematopoyético en el día +16 tras esta segunda infusión.

Edad	Diagnóstico	Donante	Fuente de Progenitores	CD34 x10 ⁶ /Kg infundidas	Fallo del injerto	Tipo de rescate	Día de la infusión	Resultado
42	LMC	NE	MO	2,5	Primario	Auto	+36	Vivo
45	LMC	EI	MO	1,63	Primario	Alo	+44	Muerte
34	LLA	NE	MO	2,20	Primario	Alo	+40	Muerte
12	Fanconi	NE	SP	1,85	Primario	No	No	Muerte
21	LLA	NE-mis	SCU	,10	Primario	No	No	Muerte
46	SMD	EI	SP	7.84	Primario	Alo	+34	Muerte
31	Hodgkin	NE-mis	SP	1.98	Primario	No	No	Muerte
4	LMA	NE	SCU	0.24	Primario	Auto	+50	Vivo
33	LMC	NE	MO	1.58	Secundario	Alo	+75	Muerte
1	LLA	NE	MO	3.15	Secundario	Alo	+49	Vivo
29	LLA	NE	SP	4,66	Secundario	Alo	+43	Muerte

Tabla 24.- Tabla resumen con los datos más destacables de los pacientes con fallo del injerto primario y secundario.

LMC: Leucemia Mieloide Crónica. LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda. LMA: Leucemia Mieloblástica Aguda. SMD: Síndrome Mielodisplásico. Fanconi: Anemia de Fanconi. EI: Emparentado HLA-idéntico. NE: No emparentado HLA-idéntico. NE-mis: No emparentado HLA-no idéntico. MO: médula ósea. SP: sangre periférica. SCU: sangre de cordón umbilical.



DISCUSIÓN

F.- DISCUSION

En este estudio, constituido por una amplia serie de 225 pacientes, sometidos de forma consecutiva a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (Alo-TPH), se demuestra que el análisis de una serie de parámetros reticulocitarios, durante el post-trasplante inmediato, proporciona una información muy útil, desde el punto de vista clínico, para el manejo de dichos pacientes. En el estudio, se ha objetivado que, prácticamente, en todos los pacientes que alcanzan satisfactoriamente el prendimiento mieloide (neutrófilos $>500/\mu\text{l}$), éste puede ser predicho con una media de cuatro días de antelación en base a los parámetros de maduración reticulocitarios –fracción reticulocitaria inmadura (IRF), índice de fluorescencia media (MFI) y reticulocitos de alta fluorescencia (RETH)- según los puntos de corte establecidos para estos.

Además, estos hallazgos, pueden ser aplicados con independencia del tipo de donante y de la fuente de la que se obtengan los progenitores hematopoyéticos. Incluso, si se objetivase la presencia en sangre periférica de $>100/\mu\text{l}$ neutrófilos como indicador del prendimiento mieloide, los tres parámetros alcanzan los puntos de corte con antelación, con significación estadística en dos de ellos, el IRF y el MFI.

Ya ha sido demostrado en series cortas de pacientes que tanto el MFI como el IRF, son parámetros con capacidad para adelantarnos en el tiempo el futuro prendimiento mieloide tras tratamiento intensivo de quimioterapia o trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (Auto-TPH), sin embargo las series publicadas tienen un escaso número de pacientes y en la gran mayoría de ellas el estudio se ha realizado en Auto-TPH, utilizando puntos de corte establecidos por otros autores siendo, además, muchas de ellas con carácter retrospectivo.

Por otro lado, en el Alo-TPH la neutropenia que se origina es más prolongada en el tiempo que en el Auto-TPH, efecto al que se suma el uso de agentes inmunosupresores, siendo además -debido a estas circunstancias, y a otras reseñables, como la utilización de donantes no emparentados o la infusión en determinados pacientes, de una escasa cantidad de células CD34+, como ocurre en los que reciben los progenitores procedentes de sangre de cordón umbilical- el Alo-TPH un procedimiento en el que el riesgo de fallo del injerto es mayor, lo que hace que la utilización de estos parámetros reticulocitarios aumente su interés, sobre todo, a la hora de adelantar decisiones clínicas ante complicaciones que supongan un riesgo para la vida del paciente, como el tipo de profilaxis o tratamiento antiinfeccioso o la planificación de una infusión de progenitores hematopoyéticos de rescate si se sospecha un posible fallo del injerto. Sin embargo, las series publicadas de Alo-TPH no son concluyentes debido al escaso número de pacientes incluidos y la imposibilidad de estudiar diversas variables clínicas, que identifiquen el riesgo individual de cada paciente.

Hasta ahora, uno de los principales problemas en la utilización de estos parámetros reticulocitarios había sido la estandarización de los distintos puntos de corte establecidos para cada parámetro, es decir, la falta de uniformidad a la hora de decidir lo que se entiende por prendimiento eritroide. El RETH fue el primer parámetro utilizado, siendo sustituido posteriormente por el IRF y el MFI. Para nuestro estudio, se definió con anterioridad en una serie de 60 pacientes sometidos a Auto-TPH y Alo-TPH los puntos de corte para cuatro parámetros, en base al cuartil 25 para cada uno de ellos, del día en el que se producía el prendimiento mieloide. Estos puntos de corte, han sido utilizados, por tanto de forma prospectiva en esta serie de pacientes.

Incluso recientemente, un nuevo trabajo aborda la utilidad de otro parámetro, denominado IRF-doubling time (el tiempo que tarda el IRF en doblar el nadir) en una larga serie de pacientes sometidos a Auto-TPH, sin embargo, en

nuestros resultados, dicho parámetro no tienen gran utilidad, ya que más de la mitad de los pacientes, concretamente el 54.54%, alcanzan un IRF de 0 a lo largo del procedimiento, y bien es sabido que dicha cantidad no se puede doblar, por lo que, según nuestros datos, su importancia es relativa y no extrapolable a Alo-TPH.

En la serie inicial se definió también otro parámetro de maduración reticulocitario, el volumen reticulocitario medio (VRM), sin embargo en esta serie más amplia, se ha observado, que 83 pacientes (39.7%) no han alcanzado el punto de corte establecido, y en el resto el adelanto con respecto al prendimiento mieloide es menor de 2 días, por lo que dicho parámetro ha sido eliminado en sucesivos análisis. Sin embargo se ha observado en este estudio diferentes comportamientos del VRM según la edad, el diagnóstico y la fuente de progenitores.

Como se esperaba, diversos factores clínicos tienen influencia en el prendimiento eritroide, en relación a los parámetros reticulocitarios estudiados, así como en el prendimiento mieloide. Este análisis de factores clínicos no había sido realizado de forma exhaustiva con anterioridad en ningún estudio.

En este trabajo, hemos utilizado para ello uno de los parámetros de maduración reticulocitario, concretamente el IRF, por diversas razones; es un parámetro en el que el punto de corte establecido ha sido superado por todos los pacientes -excepto 3-, en contraposición al RETH, que no ha sido alcanzado por 15 pacientes en el estudio, además nos mide porcentaje de reticulocitos y no únicamente fluorescencia como ocurre con el MFI, por otro lado el medir reticulocitos de alta y media fluorescencia, nos indica, con mayor precisión, la presencia de reticulocitos inmaduros en sangre periférica, con independencia del mayor o menor grado de inmadurez. Sin embargo, para la utilización del IRF en el análisis univariante y multivariante de los factores clínicos que influyen en el

prendimiento eritroide, demostrando con anterioridad que existe correlación entre este parámetro y los otros dos -MFI y RETH- que forman parte del estudio.

Hemos, por tanto, comprobado cómo la utilización de fuentes alternativas a la médula ósea, para la obtención de los progenitores, influyen de manera decisiva en el prendimiento, de esta forma, según los datos proporcionados, cuando los progenitores se reciben de sangre periférica, el prendimiento se adelanta varios días en el tiempo, mientras que cuando es la sangre de cordón umbilical la utilizada, se observa un retraso en el mismo, alcanzándose significación estadística, observándose asimismo, que la utilización de una mayor cantidad de células CD34+, facilita un prendimiento temprano en relación a la infusión de un menor número de dichas células, objetivándose, aunque sin significación estadística, este hecho al analizarlas por separado en cada una de las fuentes.

Otra de las variables clínicas que tiene impacto en el prendimiento es el tipo de acondicionamiento que recibe el receptor. Según nuestros resultados, se observa que la presencia de un acondicionamiento ablativo retrasa el prendimiento eritroide y mieloide. Esta circunstancia es debida, probablemente, a la mayor destrucción del microambiente medular que se produce con acondicionamientos ablativos, que además conllevan una gran inmunodepresión del receptor, por lo que mientras que lo primero favorece el fallo del injerto, lo segundo favorece el prendimiento. Además el daño en el microambiente es mayor, por el ya acumulado, en aquellos pacientes que han recibido previamente ciclos de quimioterapia/radioterapia.

Otro parámetro clínico que influye en el prendimiento es la edad, en contra de lo observado generalmente en la clínica, en base a estos resultados, el prendimiento en los pacientes adultos (≥ 14 años) es significativamente anterior a los pediátricos (< 14 años), sin embargo esta circunstancia es debida a la utilización en un mayor porcentaje de pacientes adultos -concretamente el 20.45%

respecto al 4.08% en niños- de un acondicionamiento de intensidad reducida. Cuando se estratifica en base a este criterio, se pierde la significación, y se observa, en los ablativos, que el prendimiento en los pacientes pediátricos es anterior, aunque sin significación estadística, que en los pacientes adultos, debido al mayor número de células CD34+ infundidas y la plasticidad tisular.

Además, otra variable cuya influencia resulta manifiesta en el prendimiento eritroide es el tipo de donante utilizado, para este estudio se han realizado dos grupos de pacientes, en el primero se han incluido aquellos que han recibido los progenitores de un donante emparentado HLA-idéntico, y en el segundo el resto - es decir no emparentados y emparentados HLA-no idénticos-. Se observa, en base a estos datos, que el prendimiento en los HLA-idénticos es significativamente anterior en el tiempo que en el otro grupo de pacientes, debido en gran parte a la presencia de menos interacciones inmunológicas entre donante y receptor.

De entre las variables que no han presentado significación, destaca la compatibilidad AB0, se ha observado que no existe diferencias en cuanto al prendimiento basado en los parámetros reticulocitarios, por lo que la incompatibilidad mayor AB0 no retrasa el prendimiento eritroide inmediato, sin embargo los dos casos de pacientes que alcanzaron satisfactoriamente el prendimiento mieloide sin ningún dato anterior ni posterior de prendimiento eritroide, eran A1o-TPH con incompatibilidad mayor AB0. Además, de los 8 pacientes en los que el prendimiento eritroide fue posterior al mieloide, 3 de ellos (37.5%) presentaban incompatibilidad mayor AB0, 3 (37.5) eran AB0 compatibles y 2 (25%) presentaban incompatibilidad menor AB0.

Por último, respecto a este apartado, destacar que en el análisis multivariante, la presencia del tipo de acondicionamiento mantiene la significación estadística, lo que indica que a igualdad del resto de variables, la presencia de un acondicionamiento ablativo retrasa el prendimiento eritroide (3.7 veces). También

en el análisis multivariante se observa como el tipo de fuente influye, a igualdad del resto de variables, en el prendimiento eritroide, de esta forma, aquellos pacientes que reciben los progenitores de sangre periférica alcanzan un prendimiento anterior que aquellos que lo hacen de médula ósea, mientras que los que los reciben de sangre de cordón umbilical, tienen un prendimiento posterior a los que lo hacen de médula.

Por otro lado, en este estudio hemos realizado un análisis novedoso, como es el periodo de tiempo con el que los parámetros reticulocitarios adelantan el prendimiento mieloide en determinados grupos de pacientes según distintas variables clínicas. De forma global, en la serie, se ha observado que el prendimiento eritroide se produce unos 4 días antes que el mieloide -en base al IRF y el MFI- y unos 3,5 días según el RETH, manteniéndose estas cifras cuando se estratifica en base al tipo de donante. Asimismo, se concluye que, de las distintas variables clínicas estudiadas, algunas de ellas no tienen impacto en los días con los que los parámetros reticulocitarios nos adelantan el prendimiento mieloide, sin embargo, otras si tienen influencia significativa en este estudio.

La más importante es la fuente de la que se obtienen los progenitores hematopoyéticos, cuando se extraen de médula ósea, el tiempo con el que predicen el prendimiento mieloide es inferior a 4 días, mientras que cuando lo hacen de sangre periférica es ligeramente superior a 4 días, sin embargo, cuando se analizan únicamente aquellos que recibieron un acondicionamiento mieloablativo, se ve que si se reciben los progenitores de sangre periférica el tiempo con el que se predice el prendimiento mieloide es mínimamente inferior a cuando lo hacen de médula ósea, esta diferencia se debe a que en los pacientes que reciben un Alo-TPH-AIR la diferencia con la que precedimos el prendimiento mieoide es mayor que en aquellos que reciben un Alo-TPH convencional.

No obstante, el dato de mayor importancia, se encuentra en los pacientes que reciben los progenitores de sangre de cordón umbilical, en ellos se observa, que casi con una semana de antelación los parámetros de maduración reticulocitaria nos predicen el prendimiento mieloide. Por lo que de forma general, se puede objetivar que cuanto mayor es la cantidad de progenitores infundidos en el receptor, menor es la diferencia temporal con la que somos capaces de predecir el prendimiento mieloide en relación a los parámetros reticulocitarios, dato que se confirma al estudiar, en base a la mediana ($3.1 \times 10^6/\text{kg CD34+}$), aquellos pacientes que con independencia de la fuente, reciben una cantidad de progenitores inferior o superior a la misma.

Esta novedosa información es de suma importancia, ya que, el Alo-TPH con progenitores obtenidos de sangre de cordón umbilical, es un procedimiento con una elevada tasa de fallo del injerto y con un periodo de citopenia prolongado en el tiempo, por lo que la aparición de cuadros infecciosos es muy frecuente, poniendo ambas complicaciones en riesgo la vida del paciente. Por esto, generalmente, si en el día +28 no existen datos de prendimiento mieloide, es necesario, tras estudios de quimerismo, poner en marcha los mecanismos logísticos, para la obtención de nuevos progenitores con los que realizar una segunda infusión de rescate.

Con los datos aportados en este estudio, la toma de decisiones se puede adelantar en el tiempo, ya que si alrededor del día +22 no existen datos de prendimiento eritroide, sabemos que en el día +28 no se alcanzará el prendimiento mieloide, y se puede comenzar la activación de los mecanismos reseñados, previo estudio del quimerismo. Pero, si entre los días 23-28 existe prendimiento eritroide, en base a los parámetros utilizados, no alcanzándose el mieloide en el día +28, es conveniente esperar varias fechas, a que este se produzca. Por otro lado, si en el día +28 no hay datos de prendimiento eritroide, debemos iniciar el proceso para asegurar una segunda infusión, ya que sabemos que hasta el día +35 no se alcanzará prendimiento mieloide, y sobre todo que las

posibilidades de que el paciente haya desarrollado un fallo del injerto son muy altas.

Similar situación se puede adoptar, en relación a una posible patología infecciosa que requiera un determinado tipo de tratamiento, como la infusión de granulocitos, en base a la futura recuperación mieloide.

La utilización de metotrexate (MTX) en pauta corta (15 mg/m²/día +1 y 10 mg/m²/días +3, +6 y +11) como profilaxis de la EICH, acorta significativamente el tiempo con el que somos capaces de predecir el prendimiento mieloide, con independencia de la fuente utilizada, esto es debido, probablemente a que la utilización de MTX elimina células progenitoras en división en estos primeros días tras el Alo-TPH, siendo las relacionadas con la serie roja, las primeras en manifestarse en la médula ósea, por lo que afectaría principalmente a las mismas, retrasando su capacidad de proliferación y su salida al torrente circulatorio, acortando de esta forma la diferencia temporal que existe entre el prendimiento eritroide y mieloide.

La utilización de radioterapia, disminuye significativamente el tiempo con el que predecimos, con estos parámetros reticulocitarios, el prendimiento mieloide. Este hecho se basa, de forma manifiesta, en los Alo-TPH de cordón umbilical que reciben el acondicionamiento sin radioterapia, sin embargo, cuando se eliminan del estudio, en el resto de pacientes se mantiene esta tendencia aunque sin alcanzar significación. Esto es debido no sólo a la inmunosupresión que genera la radioterapia, sino también y en mayor medida a la destrucción del microambiente medular que ocasiona en relación a otros acondicionamientos quimioterápicos que incluyen otros agentes inmunosupresores como el busulfan.

En nuestro servicio, hemos adoptado en la práctica clínica diaria el estudio de estos parámetros de maduración reticulocitaria en los pacientes que se someten a un Alo-TPH. Según nuestros resultados, los pacientes que reciben los

progenitores de un donante emparentado HLA-ídéntico o bien de médula ósea, deben superar los puntos de corte establecidos para el MFI y el IRF antes del día +21, así como aquellos no emparentados que deben alcanzar dichos puntos de corte en ese mismo día. Por último, en los pacientes que reciben los progenitores de sangre de cordón umbilical, si en el día +28 no han alcanzado el prendimiento eritroide, en base a los parámetros reseñados, deben ponerse en marcha, tras el estudio de quimerismo, los mecanismos logísticos para la solicitud de un injerto alternativo, alogénico o autólogo, según la disponibilidad. De todas forma, es necesario conocer que el fallo del injerto ocurre en aproximadamente un 5% de los pacientes que se someten a este complejo proceso terapéutico, por lo que la utilización de esta técnica, en caso de no poder aplicarse rutinariamente, si debería, al menos, valorarse en determinados tipos de Alo-TPH, como los de sangre de cordón umbilical, los no emparentados, los HLA no idénticos o aquellos pacientes que han recibido previamente varios ciclos de quimioterapia intensiva, o no son trasplantados en primera remisión completa .



CONCLUSIONES

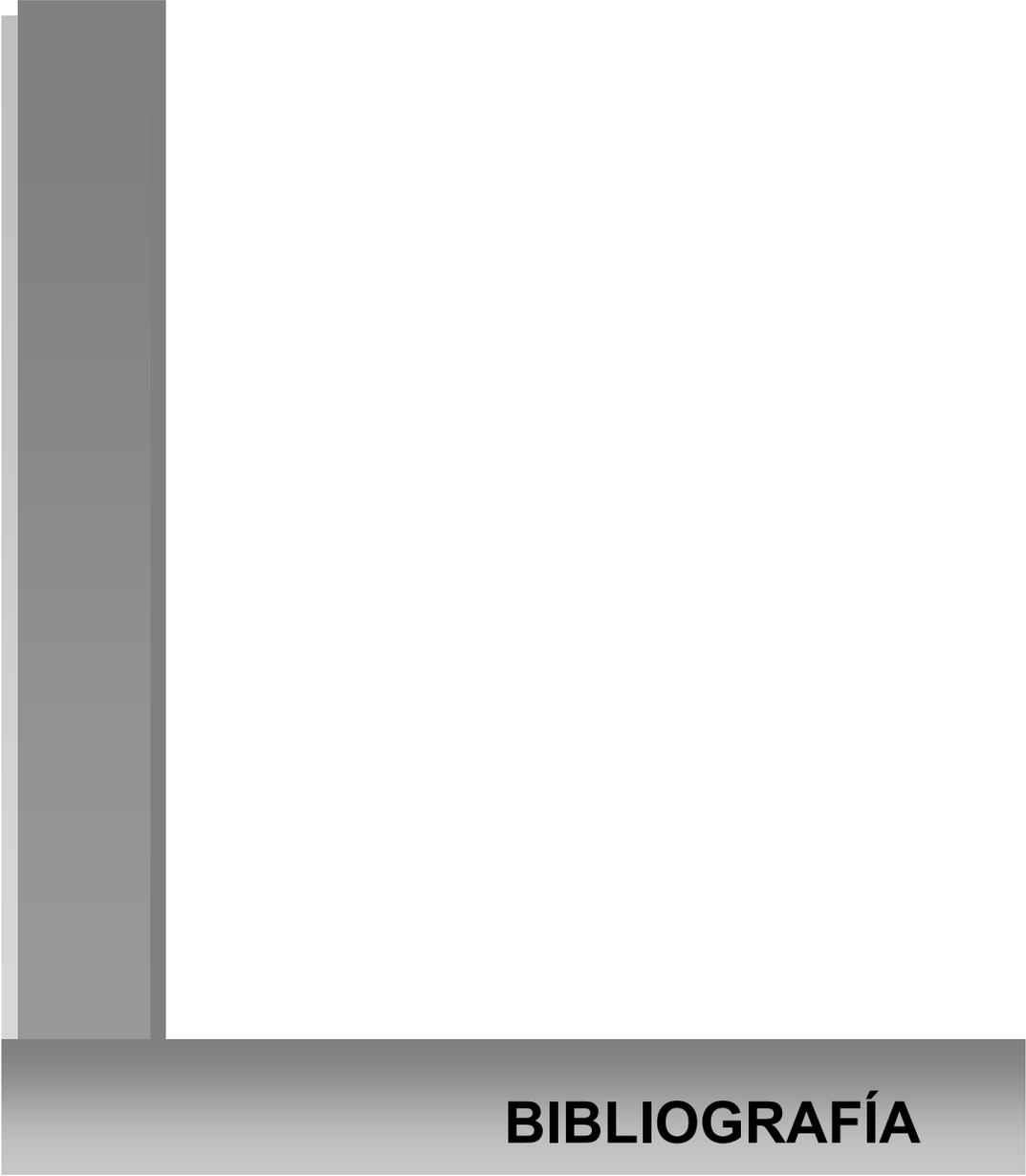
G.- CONCLUSIONES

1.- La aparición de reticulocitos en sangre periférica, derivados de la eritropoyeisis del donante, es anterior a la aparición de neutrófilos. En este sentido, el estudio de tres parámetros de maduración reticulocitaria -fracción reticulocitaria imadura (IRF), índice de fluorescencia media (MFI) y reticulocitos de alta fluorescencia (RETH)- son indicadores de prendimiento mieloide tras un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

2.- Determinados factores clínicos, como la fuente de progenitores utilizada, el tipo de donante, la cantidad de células CD34+ infundidas y el tipo de acondicionamiento influyen en el prendimiento eritroide, siendo este último factor independiente. La incompatibilidad ABO no tiene ninguna influencia en el prendimiento eritroide inmediato.

3.- En aquellos pacientes que reciben los progenitores de sangre de cordón umbilical el tiempo con el que los parámetros reticulocitarios predicen el prendimiento mieloide es de casi una semana, mientras que si los reciben de médula ósea o sangre periférica el espacio de tiempo es de unos 4.5 y 4 días, respectivamente. Estos datos, permiten adelantar en varios días la toma de decisiones en los pacientes en los que exista alguna complicación vital, o bien facilitar la puesta en marcha de mecanismos logísticos para valorar una segunda infusión de progenitores. De forma generalizada, cuanto menos cantidad de progenitores presente el injerto, mayor es la diferencia temporal con la que se puede predecir el prendimiento mieloide, en base a los parámetros reticulocitarios.

4.- Los pacientes más susceptibles de presentar fallo primario del injerto, como son aquellos que reciben los progenitores procedentes de sangre de cordón umbilical, los no emparentados o los HLA no idénticos, son los que más se beneficiarían de la aplicación rutinaria de esta técnica.

A decorative graphic consisting of a vertical grey bar on the left and a horizontal grey bar at the bottom, forming an L-shape. The word "BIBLIOGRAFÍA" is centered within the horizontal bar.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- **Velpeau, A.** Sur la resorption du pusset sur l'alteration du sang dans les maladies clinique de persection nenemant. Premier observation. Rév. Méd. 1827; 2: 216.
- 2.- **Solly S.** Remarks on the pathology of mollities ossium, with cases. Med Chir Trans 1844; 27:435-61
- 3.- **Khaler O.** Zur Symptomatologie des multiplen myeloma : Beobachtung von albuminurie. Prog Med Wochnschr 1889 ; 14 :33-45.
- 4.- **Ehrlich P.** Ueber einem Fall von Anämie mit Bmerkungen über regenerative Veränderungen des Knochenmarks. Charite Ann 1888; 13:301.
- 5.- **Von Leube W.** Rapid verlaufende schwere Anämie mit gleichzeitiger leukämischer Veränderung des Blutbildes. Klin Wochenschr 1900; 37: 85
- 6.- **Block M, Jacobson LO, Bethard WF.** Preleukemic acute leukemia. JAMA 1953; 152:1018.
- 7.- **Brown-Sequard CE, D'Ársonval JA.** Recherches sur les extraits liquides retirés des glands. Archives de Physiologie. 1981, Paris, v. III
- 8.- **Santos GW.** History of bone marrow transplantation. Clin Haem 1983;12:611-39.
- 9.- **Osgood EE, Riddle MC, Mathews TJ.** Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow; case report. Ann Intern Med 1939;13:357-67.
- 10.- **Jacobson LO, Marks EK.** Role of the spleen in radiation injury. Proc Soc Exp Biol Med 1949;70:7440.
- 11.- **Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, et al.** Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. J Natl Cancer Inst 1951;12:197-201.
- 12.- **Barnes DWH, Loutit JF.** What is the recovery factor in spleen? Nucleonics 1954;12: 68-71.
- 13.- **Billingham RE.** The biology of graft-versus-host reactions. Harvey Lect 62:21-78. 1966.
- 14.- **Thomas ED , Lochte HL, Jr.** Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy . N Eng J Med 1957;257:491.

- 15.- **Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, et al.** Succesfull allogeneic marrow transplant in man: Chimerism, induced specific tolerance an possible anti-leukemic effects. *Blood* 179:179-187. 1965
- 16.- **Storb R, Epstein RB, Graham TC, et al.** Methotrexate regimens for contro of graft-versus-host disease in dogs with allogeneic marrow grafts. *Transplantation* 9: 240-246, 1970.
- 17.- **Thomas ED, Lochte HL, Cannon JH, et al.** Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. . *J Clin Invest.* 1959, 38: 1709
- 18- **Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, et al.** One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplant. *Blood* 49:511-533, 1977.
- 19.- **Dausset J.** Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematologica* 1958;20:156-66.
- 20.- **Colombani J, Dausset J.** Human histocompatibility. *Pathol Biol (Paris)*; 17:281-299, 1969.
- 21.- **Mathé G., Amiel J.L., Schwarzenberg L., et al.** Hemopoietic chimera in man after allogeneic (homologous) bone marrow transplantation. Control of secondary syndrome. Specific tolerance due to the chimerism, *Brit. Med. J.* 1963, 2: 1633-1635, 1963
- 22.- **Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, et al.** Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic imunological deficiency. *Lancet* 2:1366-1369, 1968.
- 23.- **Santos GW, Sensenbrenner LL, Anderson PN, et al.** HLA-identical marrow transplants in aplastic anemia, acute leuemia, and lymphosarcoma employing cyclophosphamide. *Tansplantation Proc* 1976; 8:607-610.
- 24.- **O'Really R, Dupont B, Pahwa S, et al.** Successful hematologic and imunologic reconstitution of severe combined imunodeficiency by transplantation of marrow from an unrelated donor. *N Engl J Med* 1977; 297: 1311-18.
- 25.- **Thomas ED, Buckner CD, Clift RA, et al.** Marrow transplant for acute nonlymphoblastic leukaemia in first remission. *N Engl J Med* 1979; 301:597-599.
- 26.- **Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, et al.** Marrow transplant for acute nonlymphoblastic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N Engl J Med* 1983; 309:1347-1353.
- 27.- **Kessinger A, Smith DM, Strandjord SE, et al.** Allogeneic transplantation of blood derived, T cell-depleted hemopoietic stem cells after myeloalbativ

treatment in a patient with acute lymphoblastic leukemia. Bone marrow transplantation 1989; 4(6):643-646.

28.- **Maximow A.** Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedene Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere, Folia Haematol. (Leipzig) 1909; 8: 125-141.

29.- **Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al.** Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N Eng J Med 1989; 321:1174-1178.

30.- **Giralt S, Estey E, Albitar M, et al.** Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. Blood 1997; 89:12-20.

31.- **Slavin S, Nagler A, Naparstek E, et al.** Nonmyeloablative stem cell transplant and cell therapy as an alternative to conventional marrow transplant with lethal cytoablation for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. Blood 1998; 91:756-763.

33.- **Storb R, Yu C, Wagner JL, et al.** Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation. Blood. 1997;89:3048-3054.

33.- **Nilsson SK, Simmons PJ.** Transplantable stem cells: home to specific niches. Curr Opin Hematol. 2004;11:102-106.

34.- **Cui J, Wahl RL, Shen T, et al.** Bone marrow cell trafficking following intravenous administration. Br J Haematol. 1999;107:895-902.

35.- **Schofield R.** The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood cells. 1978; 4:7- 25

36.- **Lapidot T, Dar A, Kollet O.** How do stem cells find their way home? Blood. 2005;106:1901-1910.

37.- **Quesenberry PJ, Becker PS.** Stem cell homing: Rolling, crawling, and nesting. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95:15155-15157.

38.- **Tavassoli M, Hardy CL.** Molecular basis of homing of intravenously transplanted stem cells to the marrow. Blood. 1990;76:1059-1070.

- 39.- **Feng Q, Chow PK, Frasonni F, et al.** Nonhuman primate allogeneic hematopoietic stem cell transplantation by intraosseous vs intravenous injection: Engraftment, donor cell distribution, and mechanistic basis. *Exp Hematol*, 2008. In press
- 40.- **Plett PA, Frankovitz SM, Orschell CM.** Distribution of marrow repopulating cells between bone marrow and spleen after transplantation. *Blood*. 2003; 102:2285-2291
- 41.- **Oostendorp RA, Ghaffari S, Eaves CJ.** Kinetics of in vivo homing and recruitment into cycle of hematopoietic cells are organ-specific but CD44-independent. *Bone Marrow Transplant*. 2000;26:559-566
- 42.- **Van Hennik PB, de Koning AE, Ploemacher RE.** Seeding efficiency of primitive human hematopoietic cells in nonobese diabetic/severe combined immune deficiency mice: implications for stem cell frequency assessment. *Blood*. 1999;94:3055–3061.
- 43.- **Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al.** Intracoronary autologous bonemarrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004;364:141–148.
- 44.- **Butcher EC.** Leucocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*. 1991;67:1033-1036.
- 45.- **Quesenberry P, Colvin G, Abedi M.** Perspective: fundamental and clinical concepts on stem cell homing and engraftment: a journey to niches and beyond. *Exp Hematol* 2005; 33:9–19.
- 46.- **Zou X, Shinde Patil V, Dagia N, et al.** PSGL-1 derived from human neutrophils is a high efficiency ligand for endothelium expressed E-selectin under flow. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 289:C415–C424.
- 47.- **Frenette PS, Subbarao S, Mazo IB, et al.** Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing in bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:14423-14428.
- 48.- **Xia L, McDaniel J, Yago T, et al.** Surface fucosylation of human cord blood cells augments binding to P-selectin and E-selectin and enhances engraftment in the bone marrow. *Blood* 2004; 104:3091-3096
- 49.- **Katayama Y, Hidalgo A, Furie BC, et al.** PSLG-1 participates in E-selectin-mediated progenitor homing to bone marrow: evidence for cooperation between E-selectin ligands and alpha4 integrin. *Blood*. 2003; 102:2060-2067

- 50.- **Solanilla A, Grosset C, Duchez P, et al.** Flt3-ligand induces adhesion of haematopoietic progenitor cells via a very late antigen (VLA)-4- and VLA-5-dependent mechanism. *Br J Haematol.* 2003;120:782-786.
- 51.- **Wright N, Hidalgo A, Rodriguez-Frade J, et al.** The chemokine stromal derived factor-1 alpha modulates alpha4beta7 integrin mediated lymphocyte adhesion to mucosal addressin molecule-1 and fibronectin. *J Immunol* 2002; 168:5268– 5277.
- 52.- **Papayannopoulou T, Priestley GV, Nakamoto B, et al.** Molecular pathways in bone marrow homing: dominant role of alpha(4)beta(1) over beta(2)-integrins and selectins. *Blood* 2001;98:2403-2411.
- 53.- **Frenette P, Subbarao S, Mazo I, et al.** Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor cell homing to bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:14423–14428.
- 54.- **Papayannopoulo T, Craddock C, Nakamoto B, et al.** The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanism of lodgement of transplanted murine hemapoietic progenitors between bone marrow and spleen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:9647-9651.
- 55.- **Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, et al.** The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34+ cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment in NOD/SCID mice. *Blood* 2000; 95:3289-3296
- 56.- **Peled A, Petit I, Kollet O, et al.** Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 1999; 283:845–848.
- 57.- **Voermans C, Kooi M, Rodenhuis S, et al.** In vitro migratory capacity of CD34p cells is related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation. *Blood* 2001; 97:799–804.
- 58.- **Lapidot T.** Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID amd B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;938:83-95
- 59.- **Lapidot T, Dar A, Kollet O.** How do stem cells find their way home? *Blood* 2005; 106:1901–1910.
- 60.- **Askenay N, Farkas DL.** In vivo imaging studies of the effect of recipient conditioning, donor cell phenotype and antigen disparity on homing of haematopoietic cells to the bone marrow. *Br J Haematol.* 2003;120:505-515.

- 61.- **Meyer REB, Braun RD, Dewhirst MW.** Anesthetic considerations for the study of murine tumor models. In: Teicher BA, ed. Tumor models in cancer research. Totowa, NJ: Humana Press Inc. 2002:407-731
- 62.- **Yoshimoto M, Shinohara T, Heike T, et al.** Direct visualization of transplanted hematopoietic cell reconstitution in intact mouse organs indicates the presence of a niche. *Exp Hematol.* 2003;31:733-740. Erratum in: *Exp Hematol.* 2003;31:1135-1138.
- 63.- **Askenay N, Farkas DL.** Optical imaging of PKH-labeled hematopoietic cells in recipient bone marrow in vivo. *Stem Cells* 2002. 20:501-513.
- 64.- **Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, et al.** Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science.* 2001;294:1933-1936
- 65.- **Simmons PJ, Zannettino A, Gronthos S, et al.** Potential adhesion mechanism for localisation of haemopoietic progenitors to bone marrow stroma. *Leuk Lymph.* 1994;12:353-363.
- 66.- **Taichman R, Emerson S.** Human osteoblast support hematopoiesis through the production of granulocyte-colony stimulating factor. *J Exp Med* 1994; 179:1677-1682.
- 67.- **Nilsson SK, Debatis ME, Dooner MS, et al.** Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine marrow in situ. *Histochem Cytochem.* 1998; 46:371-377.
- 68.- **Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA.** Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences on the localization of stem cell niches. *Blood.* 2001; 97:2293-2299.
- 69.- **Weiss L.** The hematopoietic microenvironment of the bone marrow: an ultrastructural study of the stroma in rats. *Anat Rec.* 1976;186:161-184.
- 70.- **Nilsson SK, Haylock DN, Johnston HM, et al.** Hyaluronan is synthesized by primitive hemopoietic cells, participates in their lodgement at the endosteum following transplantation, and is involved in the regulation of their proliferation and differentiation in vitro. *Blood.* 2003;101:856-862
- 71.- **Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, et al.** Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 2005;106:1232-1239

- 72.- **Driessen RL, Johnston HM, Nilsson SK.** Membrane-bound stem cell factor is a key regulator in the initial lodgement of stem cells within the endosteal marrow region. *Exp Hematol.* 2003;31:1284-1291
- 73.- **Long MW, Dixit VM.** Thrombospondin functions as a cytoadhesion molecule for human hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 1990;75:2311-2318.
- 74.- **Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW et al.** Osteoblastic cells regulate the hematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003;425:841-846.
- 75.- **Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, et al.** Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood.* 2004;103:3258-3264.
- 76.- **Taichman RS, Reilly MJ, Emerson SG.** The hematopoietic microenvironment: osteoblasts and the hematopoietic microenvironment. *Hematology.* 2000;4:421-426.
- 77.- **El-Badri NS, Wang BY, Cherry, et al.** Osteoblasts promote engraftment of allogeneic hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 1998;26:110-116.
- 78.- **Zhang J, Niu C, Ye L, et al.** Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003;425:836-841.
- 79.- **Adams G, Chabner K, Alley I, et al.** Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* 2006; 439:599-603.
- 80.- **Park IK, Qian D, Kiel M, et al.** Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cell. *Nature.* 2003;423:302-305.
- 81.- **Reya T, Duncan AW, Ailles L, et al.** A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature.* 2003;423:409-414.
- 82.- **Bjornsson JM, Larsson N, Brun AC, et al.** Reduced proliferative capacity of hematopoietic stem cells deficient in Hoxb3 and Hoxb4. *Mol Cell Biol* 2003, 23:3872–3883.
- 83.- **Brun AC, Bjornsson JM, Magnusson M, et al.** Hoxb4 deficient mice have normal hematopoietic development but exhibit a mild proliferation defect in hematopoietic stem cells. *Blood* 2004, 103(11): 4126-4133.
- 84.- **Willert K, Brown JD, Danenberg E, et al.** Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003, 423:448–452.

- 85.- **Hoggatt J, Singh P, Sampath J, et al.** Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival and proliferation. *Blood* 2009, (Epub ahead of print)
- 86.- **Adams G, Alley I, Chung U, et al.** Haematopoietic stem cells depend on Galpha(s)-mediated signalling to engraft bone marrow. *Nature* 2009.
- 87.- **Ottinger HD, Beelen DW, Scheulen B et al.** Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood* 1996; 88;2775-2779.
- 88.- **Tabata M, Kai S, Satake A, et al.** Relationships between hematological recovery and overall survival in older adults undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Inter. Med.* 2005; 44: 35-40.
- 89.- **Eapen M, Horowitz MM, Klein JP, et al.** Higher mortality after allogeneic peripheral-blood transplantation compared with bone marrow in children and adolescents: the Histocompatibility and Alternate Stem Cell Source Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *J.Clin. Oncol.* 2004; 22:4872-4880.
- 90.- **Chilton PM, Huang Y, Ildstad DT.** Bone marrow cell graft engineering: from bench to bedside. *Leuk Lymphoma* 2001; 41: 19-34.
- 91.- **Quesenberry PJ, Colvin GA, Abedi M, et al.** The marrow stem cell: the continuum. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 32 (Suppl. 1);S19-22.
- 92.- **Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al.** Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275;964-967.
- 93.- **Choi K, Kennedy M, Kazarov A, et al.** A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998;125;725-732.
- 94.- **Elmaagacli AH, Runkel K, Steckel N, et al.** A comparison of chimerism and minimal residual disease between four different allogeneic transplantation methods in patients with chronic myelogenous leukemia in first chronic phase. *Bone Marrow Transplant.* 2001; 27:809-815.
- 95.- **Román J, Martín C, Torres A, et al.** Importance of mixed chimerism to predict relapse in persistently BCR/ABL positive long survivors after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 1998; 28: 541-550.
- 96.- **Serrano J, Román J, Sánchez J, et al.** Molecular analysis of lineage-specific chimerism and minimal residual disease by RT-PCR of p210 (BCR-ABL) and p190 (BCR-ABL) after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid

leukemia: increasing mixed myeloid chimerism and p190 (BCR-ABL) detection precede cytogenetic relapse. *Blood* 2000; 95:2659-2665.

97.- **Thiele J, Wickenhauser C, Kvasnicka HM, et al.** Mixed chimerism of bone marrow CD34+ progenitor cells (genotyping, bcr/abl analysis) after allogeneic transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Transplantation* 2002; 72:982-986.

98.- **Kvasnicka HM, Thiele J.** Bone marrow angiogenesis: methods of quantification and changes evolving in chronic myeloproliferative disorders. *Histol. Histopathol.* 2004; 19:1245-1260.

99.- **Rousselet MC, Krjean A, Guyetant S, et al.** Histopathology of bone marrow after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia. *Pathol. Res. Pract.* 1996; 192:790-795.

100.- **Thiele J, Kvasnicka HM, Beelen DW, et al.** Erythropoietic reconstitution, macrophages and reticulin fibrosis in bone marrow specimens of CML patients following allogeneic transplantation. *Leukemia* 2000; 14:1378-1385.

101.- **Hanspal M.** Importance of cell-cell interactions in regulation of erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* 1997; 4:142-147.

102.- **Thiele J, Kvasnicka HM, Beelen DW, et al.** Macrophages and their subpopulations following allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia. *Virchows Arch.* 2000; 437:160-166.

103.- **Thiele J, Kvasnicka HM, Dietrich H, et al.** Dynamics of bone marrow changes in patient with chronic idiopathic myelofibrosis following allogeneic stem cell transplantation. *Histol. Histopathol.* 2005; 20:879-889.

104.- **van Marion AMW, Thiele J, Kvasnicka HM, et al.** Morphology of the bone marrow after stem cell transplantation. *Histopathology* 2006; 48:329-342.

105.- **Blau IW, Basara N, Serr A, et al.** A second unrelated bone marrow transplant: successful quantitative monitoring of mixed chimerism using a highly discriminative PCR-STR system. *Clin Lab Haematol* 1999; 21: 133-138.

106.- **Sureda A.** Fallo del implante. *Manual de trasplante hemopoyético.* 2004. 3ª edic. Ed. Antares. Collbató.

107.- **Thomas E, Storb R, Clift RA, et al.** Bone–marrow transplantation (first of two parts). *New Engl J Med.* 1975;292:832-843.

- 108.- **Thomas E, Storb R, Clift RA, et al.** Bone–marrow transplantation (second of two parts). *New Engl J Med.* 1975; 292:895-902.
- 109.- **Davies SM, Weisdorf DJ, Haake RJ ,et al.** Second infusion of bone marrow for treatment of graft failure after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 73-77.
- 110.- **Woolfrey A, Anasetti C.** Allogeneic hematopoietic stem-cell engraftment and graft failure. *Pediatr Transplant* 1999; 3 suppl 1:35-40.
- 111.- **Stucki A, Leisenring W, Sandmaier BM, et al.** Decreased rejection and improved survival of first and second marrow transplant for severe aplastic anemia (a 26-year retrospective analysis). *Blood* 1998; 92: 2742-2749.
- 112.- **Storb R, Prentice RL, Thomas ED.** Marrow transplantation for treatment of aplastic anemia. An analysis of factors associated with graft rejection. *N Engl J Med* 1977; 296:61-66.
- 113.- **Cohena Y, Nagler A.** Hematopoietic stem-cell transplantation using umbilical-cord blood. *Leuk Lymphoma.* 2003; 44:1287-1299.
- 114.- **Narimatsu H, Kami M, Miyakoshi S, et al.** Graft failure following reduced-intensity cord blood transplantation for adult patients. *Br J Haematol.* 2006 Jan;132(1):36-41.
- 115.- **Champlin RE, Horowitz MM, Van Bekkum DW, et al.** Graft failure following bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: risk factors and treatment results. *Blood* 1989; 73: 606-623.
- 116.- **Ferster A, Corazza F, Vertongen F, et al.** Transplanted sickle-cell disease patient with autologous bone marrow recovery after graft failure develop increased levels of fetal haemoglobin wich corects disease severity. *Br J Haematol* 1995; 90: 804-808.
- 117.- **Storb R, Prentice RL, Thomas ED, et al.** Factors associated with graft rejection after HLA-identical marrow transplantation for aplastic anemia. *Br J Haematol* 1983;55:573-585.
- 118.- **Filipovich A.** Hematopoietic cell transplantation for correction of primary immunodeficiencies. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 42: S49-S52
- 119.- **Bosserman LD, Murray C, Takvorian T, et al.** Mechanism of graft failure in HLA-matched and HLA-mismatched bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 1989; 4: 239-245.

- 120.- **Beatty PG, Clift RA, Mickelson EM, et al.** Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings. *N Engl J Med* 1985;313:765-771.
- 121.- **Martín PJ, Akatsuka Y, Hahne M, et al.** Involvement of donor T-cell cytotoxic effector mechanisms in preventing allogeneic marrow graft rejection. *Blod* 1998; 92: 2177-2181.
- 122.- **Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, et al.** T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* 1991;78:2120-2130.
- 123.- **Bacigalupo A.** Hematopoietic stem cell transplants after reduced intensity conditioning regimen (RI-HSCT): report of a workshop of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 803-805.
- 124.- **Le Blanc K, Remberger M, Uzunel M, et al.** A comparison of nonmyeloablative and reduced-intensity conditioning for allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2004;78:1014-1020.
- 125.- **Petersdorf EW, Kollman C, Hurley CK, et al.** Effect of HLA class II gene disparity on clinical outcome in unrelated donor hematopoietic cell transplantation for chronic myeloid leukemia: the US National Marrow Donor Program Experience. *Blood* 2001; 98: 2922-2929.
- 126.- **Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, et al.** Association of HLA-C disparity with graft failure after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood* 1997; 89: 1818-1823.
- 127.- **Remberger M, Watz E, Ringden O, et al.** Major ABO blood group mismatch increases the risk for graft failure after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Nmarrow Transplant.* 2007;13:675-682.
- 128.- **Goss GD, Wittwer MA, Bezwoda WR et al.** Effect of natural killer cells on syngenic bone marrow : in vitro and in vivo studies demonstratinf graft failure due to NK cells in an identical twin treated by bone marrow transplantation. *Blood* 1958; 66: 1043-1046.
- 129.- **Quinones RR.** Hematopoietic engraftment and graft failure after bone marrow transplantation. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1993; 15: 3-17.
- 130.- **Rosenfeld CS, Rybka WB, Weinbaum D et al.** Late graft failure due to dual bone marrow infection with variants A and B of human herpesvirus-6. *Exp Hematol* 1995; 23: 626-629.

131.- **Steffens HP, Podlech J, Kurz S et al.** Cytomegalovirus inhibits the engraftment of donor bone marrow cells by downregulation of hemopoietin gene expression in recipient stroma. *J Virol* 1998; 72: 5006-5015.

132.- **Tomonari A, Takahashi S, Ooi J et al.** Preemptive therapy with ganciclovir 5 mg/kg once daily for cytomegalovirus infection after unrelated cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 41:371-376.

133.- **Beguín Y, Collignon J, Laurent C, et al.** Spontaneous complete remission and recovery of donor hemopoiesis without GVHD after relapse and apparent marrow graft rejection in poor-prognosis myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 1996; 94: 507-509.

134.- **Korper S, Hutter G, Blau W, et al.** Successful treatment of partial graft failure after matched unrelated donor stem cell transplantation by a combination of aneastim (stem cell factor) and granulocyte colony stimulating factor in a patient with heavily pre-treated chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2008; 25:1-3.

135.- **Badell I.** EBMT Paediatric Working Party Cytokines following SCT: indications and controversies. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 41:S27-29.

136.- **Zauchá JM, Gooley T, Bensinger WI, et al.** CD34 cell dose in granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cell grafts affects engraftment kinetics and development of extensive chronic graft versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplantation. *Blood* 2001; 98: 3221-3227.

137.- **Urbano-Ispizua A, Carreras E, Mann P, et al.** Allogeneic transplantation of CD34(+) selected cells from peripheral blood from human leukocyte antigen-identical siblings: detrimental effect of a high number of donor CD34(+) cells? *Blood* 2001; 98: 2352-2357.

138.- **Zecca M, Perotti C, Marradi P, et al.** Recombinant human G-CSF-mobilized peripheral blood stem cells for second allogeneic transplant after bone marrow graft rejection in children. *Br J Haematol* 1996; 92: 432-434.

139.- **Grandage VL, Cornish JM, Panphilon DH, et al.** Second allogeneic bone marrow transplants from unrelated donors for graft failure following initial unrelated donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 687-690.

140.- **Guardiola P, Kuentz M, Garban F, et al.** Second early allogeneic stem cell transplantation for graft failure in acute leukemia, chronic myeloid leukemia and aplastic anaemia. French Society of Bone Marrow Transplantation. *Br J Haematol* 2000; 111: 292-302.

- 141.- **Baiocchio G, Scambia G, Benedetti P, et al.** Autologous stem cell transplantation: sequential production of hematopoietic cytokines underlying granulocyte recovery. *Cancer Res.* 1993;53:1297-1303.
- 142.- **Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G, et al.** Kinetics of chimerism during early post-transplant period in pediatric patients with malignant and non-malignant hematologic disorders: implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejection. *Leukemia* 1999; 13:2059-2069
- 143.- **Raanani P, Levi I, Holzman F, et al.** Engraftment-associated hypophosphatemia- the role of cytokine release and steep leukocyte rise post-stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27:311-317
- 144.- **Akpek G, Knight RD, Wright DG.** The use of oral mucosal neutrophil counts to detect the onset and resolution of profound neutropenia following high-dose myelosuppressive chemotherapy. *Am J Hematol* 2003; 72:13-19
- 145.- **Weinberg RS, Schofield JM, Lenes AL, et al.** Adult 'fetal-like' erythropoiesis characterizes recovery from bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* 1986; 63:415-24.
- 146.- **Emminger W, Emminger-Schmidmeier W, Höcker P, et al.** Myeloid progenitor cells (CFU-GM) predict engraftment kinetics in autologous transplantation in children. *Bone Marrow Transplant.* 1989; 4:415-20.
- 147.- **Davis BH, Bigelow NC.** Flow cytometric reticulocyte quantification using thiazole orange provides clinically useful reticulocyte maturity index. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113:684-689.
- 148.- **Davis BH, Bigelow N, Ball ED, et al.** Utility of flow cytometric reticulocyte quantification as a predictor of engraftment in autologous bone marrow transplantation. *Am J Hematol* 1989; 32:81-87.
- 149.- **Van den Berg H, Kluin M, Vossen JM.** Early reconstitution of haematopoiesis after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective histopathological study of bone marrow biopsy specimens. *J Clin Pathol* 1990;43:365-369
- 150.- **Van Hove L, Goossens W, Van Duppen V, et al.** Reticulocyte count using thiazole orange. A flow cytometry method. *Clin Lab Haematol.* 1990; 2:287-299.
- 151.- **Schimenti KJ, Lacerna K, Wamble A, et al.** Reticulocyte quantification by flow cytometry, image analysis, and manual counting. *Cytometry* 1992; 13(8):853-862.

- 152.- **Lazarus HM, Chahine A, Lacerna K, et al.** Kinetics of erythropoiesis after bone marrow transplantation. *Am J Clin Pathol* 1992; 97(4):574-583.
- 153.- **Davies SV, Cavill I, Bently N et al.** Evaluation of erythropoiesis after bone marrow transplantation: quantitative reticulocyte counting.- *Br J Haematol.* 1992;81:12-7.
- 154.- **Sakairi K, Miyachi H, Tanaka Y.** Frequency of the development of RNA-rich reticulocytes in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Rinsho Ketsueki.* 1992; 33:791-5.
- 155.- **Greinix HT, Linkesch W, Keil F, et al.** Early detection of hematopoietic engraftment after bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation by highly fluorescent reticulocyte counts. *Bone Marrow Transplant.* 1994; 14:307-13.
- 156.- **Spanish Multicentric Study Group for Hematopoietic Recovery.** Flow cytometric reticulocyte quantification in the evaluation of hematologic recovery.. *Eur J Haematol.* 1994; 53:293-7.
- 157.- **Vannucchi AM, Bosi A, Lombardini L, et al.** Circulating CFU-E during hematopoietic recovery after allogeneic bone marrow transplantation: relationship to erythroid engraftment. *Exp Hematol.* 1995; 23:1337-40.
- 158.- **Dalal BI, Stockford GR, Naiman SC, et al.** Criteria for marrow engraftment: comparison of reticulocyte maturity index with conventional parameters. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 17:91-2.
- 159.- **D'Onofrio G, Tichelli A, Fources C, et al.** Indicators of haematopoietic recovery after bone marrow transplantation: the role of reticulocyte measurements. *Clin Lab Haematol.* 1996; 18 S1:45-53.
- 160.- **Testa U, Rutella S, Martucci R, et al.** Autologous stem cell transplantation: evaluation of erythropoietic reconstitution by highly fluorescent reticulocyte counts, erythropoietin, soluble transferrin receptors, ferritin, TIBC and iron dosages. *Br J Haematol.* 1997; 96:762-75.
- 161.- **Sica S, Salutari P, Laurenti L, et al.** Highly fluorescent reticulocytes after CD34+ peripheral blood progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21:361-364.
- 162.- **Grotto HZ, Vigoritto AC, Noronha JF, et al.** Immature reticulocyte fraction as a criterion for marrow engraftment. Evaluation of a semi-automated reticulocyte counting method. *Clin Lab Hematol.* 1999; 21:285-287.
- 163.- **Lacombe F, Lacoste L, Vial JP, et al.** Automated reticulocyte counting and immature reticulocyte fraction measurement. Comparison of AX PENTRA 120

Retic, Sysmex R-200, flow cytometry, and manual counts. *Am J Clin Pathol.* 1999; 112:677-686

164.- **George P, Wyre RM, Bruty SJ, et al.** Automated immature reticulocyte counts are early markers of engraftment following autologous PBSC transplantation in patients with lymphoma. *J Hematother Stem Cell Res.* 2000; 9:219-223

165.- **Kageoka T.** Reticulocyte as indication of the erythroid hematopoiesis: reticulocyte fractions in peripheral blood and bone marrow. *Rinsho Byori.* 2001; 49:485-9

166.- **Torres A, Sánchez J, Lakomsky, et al.** Assessment of hematologic progenitor engraftment by complete reticulocyte maturation parameters after autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2001; 86:24-9.

167.- **Dubner D, Pérez M del R, Barboza M, et al.** Evolutionary and bone marrow recovery indicators in bone marrow transplantation after total body irradiation. *Medicina (B Aires).* 2002; 62:555-61.

168.- **Noronha JF, De Souza CA, Vigorito AC, et al.** Immature reticulocytes as an early predictor of engraftment in autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Lab Haematol* 2003; 25:47-54.

169.-**Yildirim I, Ozer Y, Yuksel MK, et al.** Erythrocyte antigen and reticulocyte engraftment after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2004 Aug, 34 (4): 352-5.

170.- **Grazziutti ML, Dong L, Miceli MH, et al.** Recovery from neutropenia can be predicted by the immature reticulocyte fraction several days before neutrophil recovery in autologous stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 37:403-409.

171.- **Molina JR, Sanchez-García J, Torres A, et al.** Reticulocyte maturation parameters are reliable early predictors of hematopoietic engraftment after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007; 13:172-182.

172.- **Parody R, Martino R, Rovira M, et al.** Severe infections after unrelated donor allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults: comparison of cord blood with peripheral blood and bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006; 12: 734-738.

