

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament de Medicina



**Impacto del Quimerismo Hematopoyético Precoz en el Injerto
tras Trasplante Alogénico de Progenitores de Sangre de
Cordón Umbilical de Donante no Emparentado para el
Tratamiento de Hemopatías Malignas**

TESIS DOCTORAL

**Presentada por:
Federico Moscardó García**

**Dirigida por:
Prof. Miguel A. Sanz Alonso
Dr. Guillermo F. Sanz Santillana**

MIGUEL ÁNGEL SANZ ALONSO, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia y Jefe del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia

GUILLERMO SANZ SANTILLANA, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia y Jefe de Sección de Hematología Clínica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia

INFORMAN

Que la tesis doctoral titulada: **“Impacto del Quimerismo Hematopoyético Precoz en el Injerto tras Trasplante Alogénico de Progenitores de Sangre de Cordón Umbilical de Donante no Emparentado para el Tratamiento de Hemopatías Malignas”** ha sido realizada bajo nuestra dirección por **Federico Moscardó García**, Licenciado en Medicina y Cirugía, y reúne, a nuestro juicio, condiciones suficientes para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al grado de doctor por la Universidad de Valencia

En Valencia a 10 de mayo de 2013

Prof. Miguel A. Sanz Alonso

Dr. Guillermo Sanz Santillana

*A mi padre, por su pasión por la ciencia
y su paciencia y amor al transmitírmela*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, los doctores Miguel A. Sanz Alonso y Guillermo Sanz Santillana. A Miguel, el jefe, le debo mucho tanto en lo profesional como en lo personal. Gracias por no perder ese lado humano que a mi me resulta tan imprescindible. Gracias por tu trato y tu comprensión y ojala pueda cumplir con tus expectativas. Guille, te debo lo que soy en el mundo del trasplante y algunas cosas más. Gracias por resultarme tan accesible y por el cariño que me muestras. Sabes que es mutuo.

Toda mi educación en el mundo de la hematología no habría sido posible sin la colaboración y la implicación de todo el personal del servicio, en especial adjuntos y residentes que hacen el trabajo cotidiano más llevadero. A Malé que me enseñó como desenvolverse en el mundo de las quimeras. Gracias por comprenderme siempre y en especial en los momentos malos. Eres un ejemplo de superación y un espejo en el que mirarse. Gracias Nelly por tu confianza. Gracias Pastorini, Carlitos, sos como un hermano Uruguayo. Al doctor de la Rubia por quien siento especial aprecio y admiración. Al doctor Martín por su humanidad y proximidad.

Reservo un apartado especial para Jaime Sanz, uno de esos amigos que por desgracia no abundan mucho. Gracias por no dejarme caer hasta el fondo, por ser esa voz que da tranquilidad y por tener esa sensibilidad y bondad que hacen de ti una gran persona por encima de lo gran médico que eres. Gracias Sara por cuidármelo con tanto amor.

Finalmente quiero recordar a mi familia y amigos, los que deje lejos de aquí y los que se han unido con los años. A mis cuñadas y cuñados con los que he vivido grandes experiencias y a mis suegros que me quieren como a un hijo. A mi madre, mi paño de lágrimas y mi balsa de aceite, por comprenderme siempre y aceptarme tal y como soy de forma incondicional. A mis hermanos, Chema y Chaume, porque sé que siempre están y estarán a mi lado, porque son un gran pedazo de mi alma. Y a mis otros hermanos, Paco y Rafa, por ser grandes.

A mis dos hijos, Fede y Nacho, a los que quiero con locura y que son el motor que mueve mi vida. Os compensaré por el tiempo invertido en esta tesis. Y a Nuria, mi mujer, mi amiga y mi compañera. La que me mantiene a flote cuando las cosas parecen desmoronarse y llena mi vida de alegría. La que me cuida todas las horas del día. My Guiding Light.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	15
1.1	RESEÑA HISTÓRICA	17
1.2	TRASPLANTE DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL	20
1.3	CARACTERÍSTICAS DE LA SCU	21
1.3.1.	Dosis celular de la SCU.....	23
1.3.2.	Compatibilidad HLA en TSCU	27
1.4	RESULTADOS CLÍNICOS DEL TSCU	28
1.4.1.	Desarrollo inicial del TSCU en el Hospital Universitario La Fe	28
1.4.2.	Estudios comparativos en TSCU	30
1.4.3.	Nuevas tendencias en TSCU.....	34
1.5	QUIMERISMO HEMATOPOYÉTICO.....	35
1.5.1.	Definición de quimerismo hematopoyético.....	35
1.5.2.	Métodos para el estudio del quimerismo hematopoyético.....	36
1.5.3.	Quimerismo Hematopoyético e Injerto	38
2.	HIPÓTESIS.....	41
3.	OBJETIVOS.....	45
3.1	OBJETIVOS PRIMARIOS.....	47
3.2	OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	47
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
4.1	SELECCIÓN Y TRATAMIENTO DE PACIENTES	51
4.1.1.	Criterios de inclusión	51
4.1.2.	Búsqueda y selección de la unidad de cordón.....	52
4.1.3.	Tratamiento de acondicionamiento	52
4.1.4.	Profilaxis y Tratamiento de la EICH	54
4.1.5.	Tratamiento de Soporte	54
4.2	ESTUDIOS DE QUIMERISMO	56

4.2.1.	Tipo de muestra para los estudios de quimerismo.....	56
4.2.2.	Selección de la técnica para el estudio del quimerismo	56
4.2.3.	Protocolo de estudio del quimerismo hematopoyético	58
4.3	DEFINICIONES	64
4.3.1.	Quimerismo Mixto.....	64
4.3.2.	Quimerismo completo.....	65
4.3.3.	Quimerismo en split o “split chimerism”	65
4.3.4.	Injerto Mieloide	67
4.3.5.	Injerto Plaquetar	68
4.3.6.	Estadio de la Enfermedad.....	68
4.3.7.	Enfermedad del Injerto contra el Huésped Aguda.....	68
4.4	ESTUDIOS ESTADÍSTICOS	71
4.4.1.	Variables incluidas en el análisis estadístico.....	71
4.4.2.	Análisis estadístico	71
5.	RESULTADOS.....	73
5.1	CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES E INJERTO.....	75
5.1.1.	Características Demográficas	75
5.1.2.	Características de las Unidades de Sangre de Cordón Umbilical	78
5.2	RESULTADOS DEL ESTUDIO DE QUIMERISMO.....	81
5.2.1.	Análisis descriptivo del quimerismo en el día 14 postrasplante.....	81
5.2.2.	Factores que influyen en el resultado del quimerismo	82
5.3	CINÉTICA DEL INJERTO MIELOIDE	88
5.3.1.	Descripción del injerto mieloide	88
5.3.2.	Análisis univariante de factores para injerto mieloide.....	89
5.3.3.	Análisis multivariante de factores determinantes de injerto mieloide.....	94
5.3.4.	Correlación entre los distintos subtipos celulares	95
5.4	FACTORES PARA FALLO PRIMARIO DE INJERTO.....	97
5.4.1.	Descripción del fallo primario de injerto	97

5.4.2.	Análisis univariante de factores para fallo de injerto primario.....	97
5.4.3.	Análisis multivariante para factores de fallo de injerto primario.....	99
5.5	INJERTO PLAQUETAR.....	99
5.5.1.	Descripción del injerto plaquetar.....	99
5.5.2.	Análisis univariante de factores para injerto plaquetar.....	100
5.5.3.	Análisis multivariante de factores para injerto plaquetar.....	105
5.6	ENFERMEDAD DEL INJERTO CONTRA EL HUÉSPED AGUDA.....	107
5.6.1.	Descripción de la EICH y análisis univariante de factores de riesgo....	107
5.6.2.	Análisis multivariante de factores de riesgo de EICH aguda.....	111
5.7	MORTALIDAD RELACIONADA CON EL TRASPLANTE.....	112
5.7.1.	Descripción de la MRT y análisis univariante de factores de riesgo.....	112
5.7.2.	Análisis multivariante de MRT.....	113
6.	DISCUSIÓN.....	115
7.	CONCLUSIONES.....	127
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	131

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN = ácido desoxiribonucleico

AREB = anemia refractaria con exceso de blastos

ATG = globulina antitimocítica

BU = Busulfán

CFU-GM = unidades formadoras de colonias granulomonocíticas

CSA = ciclosporina A

CY = ciclofosfamida

CPH = células progenitoras hematopoyéticas

CMV = citomegalovirus

CNT = celularidad nucleada total

DNE = donante no emparentado

ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group

EICH = enfermedad injerto contra huésped

EBMT = European Group for Blood and Marrow Transplantation

EMR = Enfermedad mínima residual

FISH = fluorescencia con hibridación in situ

FLU = fludarabina

HLA = Antígeno leucocitario humano

LLA = leucemia linfoblástica aguda

LLC = leucemia linfocítica crónica

LMA = leucemia mieloide aguda

LMC = leucemia mieloide crónica

LNH = linfoma no Hodgkin

MRT = mortalidad relacionada con el trasplante

PCR = polymerase chain reaction

PH = progenitores hematopoyéticos

SCU = sangre de cordón umbilical

SLE = supervivencia libre de enfermedad

SMD = síndrome mielodisplásico

STR = short tandem repeat

TMO = trasplante de médula ósea

TPH = trasplante de progenitores hematopoyéticos

TSCU = trasplante de sangre de cordón umbilical

VEB = virus de Epstein Barr

VNTR = variable number of tandem repeats

1. INTRODUCCIÓN

1.1 RESEÑA HISTÓRICA

Aunque el conocimiento de las funciones de la médula ósea se remonta al siglo XIX, el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) no comienza su verdadero desarrollo hasta bien entrada la segunda mitad del siglo XX. Existe documentación sobre la infusión de pequeñas cantidades de médula ósea en humanos para tratar la aplasia medular que data de los años 1939 y 1940 sin obtener resultados satisfactorios. Entre estos fracasos y la realización de lo que realmente pueden ser considerados los primeros trasplantes alogénicos en humanos existe un periodo de escasos avances clínicos. La idea de poder trasplantar la médula de un donante sano para tratar hemopatías diversas estaba en la mente de algunos científicos, más aún cuando Jacobson(1) y Lorenz(2) demostraron que la infusión de células del bazo o médula ósea previamente conservadas ofrecía un efecto protector en ratones frente a dosis letales de irradiación. Lo que inicialmente fue atribuido a fenómenos mediados por hormonas o factores de crecimiento contenidos en el producto infundido acabó por demostrarse que obedecía a mecanismos celulares con una alta participación de fenómenos inmunológicos. A este hecho contribuyó la demostración de quimeras de células procedentes de distintas fuentes.

Los primeros intentos de trasladar estas experiencias a los humanos resultaron de forma casi constante en continuas decepciones. Aunque en 1959 Thomas et al.(3) reportaron el primer caso de TPH singénico en una paciente con leucemia tratada con altas dosis de radioterapia y que tras la infusión de la médula ósea se recuperó de la aplasia y mantuvo la remisión durante cuatro meses, sus primeros datos usando donantes alogénicos resultaron mucho menos esperanzadores. En 1970 Bortin consiguió recopilar información referente a unos 200 trasplantes con resultados verdaderamente desalentadores ya que todos ellos habían fracasado(4). Los problemas principales a los que se enfrentaban los investigadores, sin tener clara conciencia de ello, eran el fallo del injerto y la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), debido en gran medida al profundo desconocimiento del sistema mayor de histocompatibilidad durante aquella etapa.

Mientras tanto, los estudios en animales prosiguen y en 1959 Billingham et al. describen las reacciones observadas en ratones tras la infusión de células alogénicas de médula ósea o bazo como un síndrome clínico consistente en lesiones cutáneas, diarrea, deterioro general y finalmente la muerte(5). Este cuadro clínico fue inicialmente denominado como "runt disease" o enfermedad secundaria, constituyendo posteriormente lo que hoy conocemos como EICH. De estas observaciones se extraen

conclusiones que serán de vital importancia para el desarrollo del TPH y entre las que destacamos(6):

- La existencia de células alogénicas en el receptor es necesaria para la aparición de la enfermedad secundaria.
- Ésta no aparece con el uso de donantes singénicos.
- La incidencia y gravedad de la enfermedad secundaria está relacionada con las discrepancias en diversos antígenos entre donante y receptor.

Paralelamente a estas observaciones se desarrolla el conocimiento de los antígenos leucocitarios humanos o sistema HLA, destacando su importancia en la compatibilidad entre tejidos. Diversos estudios en animales resaltan este hecho, así como la utilidad de la inmunosupresión, generalmente con metotrexate, en el éxito de estos trasplantes. Se da paso de esta manera a los estudios modernos en TPH en la década de los años 70, basados en la utilización de donantes familiares con identidad en el sistema HLA y en los que progresivamente se observa una mejora significativa en los resultados obtenidos. Estos resultados, junto con la ausencia de donantes familiares en muchos casos, estimulan el uso de donantes no emparentados, comunicándose en 1979 el primer trasplante de progenitores hematopoyéticos de donante no emparentado (TPH-DNE) llevado a cabo con éxito(7). Minimizado el riesgo de fallo de injerto, las complicaciones fundamentales que limitan el éxito del procedimiento son la EICH, las infecciones oportunistas y la recaída de la propia enfermedad que motiva el trasplante.

Hasta ese momento las claves fundamentales del éxito del TPH habían residido por tanto en el conocimiento y respeto de la barrera de histocompatibilidad. Esta actitud implica otro problema que conforme las indicaciones del trasplante van expandiéndose comienza a cobrar más importancia. Se trata de la carencia de un donante adecuado para muchos pacientes junto con el largo tiempo requerido para encontrarlo en otros muchos casos. En este nuevo contexto, la búsqueda de fuentes alternativas cobra especial importancia y se inicia el desarrollo del trasplante haploidéntico seguido del trasplante de progenitores de sangre de cordón umbilical (TSCU) como alternativas a las fórmulas convencionales.

Las características de las células de sangre de cordón umbilical (SCU) permiten abordar el trasplante a partir de injertos con discrepancias en los principales antígenos del sistema mayor de histocompatibilidad y en 1989 Gluckman et al.(8) llevan a cabo el primer TSCU en un niño con anemia de Fanconi. Sin embargo, la escasa cantidad de células contenidas en un injerto de sangre de cordón umbilical

reavivan los temores referentes al fallo de injerto y demoran el uso de esta fuente de progenitores en pacientes adultos. Hasta el año 1996 no se realiza el primer TSCU en un paciente adulto diagnosticado de una LMC, demostrando que el procedimiento es factible en estos enfermos(9). A partir de ese momento, y fundamentalmente durante la última década, el TSCU ha experimentado un notable crecimiento. Dadas las particularidades de la sangre de cordón umbilical, la investigación en los distintos aspectos del injerto hematopoyético se ha convertido en una de las líneas de trabajo fundamentales en el TSCU.

La investigación en el campo del TPH y las áreas directamente relacionadas con ella han dado lugar a grandes trabajos y notables personalidades del mundo científico. Citar a todas ellas y sus respectivas contribuciones resulta imposible en una mera reseña histórica pero entre todos ellos destacan tres nombres vinculados a esta disciplina y que fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina. Se trata de los Drs. Medawar y Burnett, premiados en 1960 por la descripción de la tolerancia inmunológica adquirida, el Dr. Jean Dausset en el año 1980 por el descubrimiento del sistema HLA y el Dr. E. Donnall Thomas que recibió el galardón en 1990 por su trayectoria en la investigación y desarrollo del trasplante de médula ósea.

1.2 TRASPLANTE DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

Los continuos avances que se han producido en el campo del TPH alogénico durante las últimas décadas han traído como resultado un aumento importante de su número de indicaciones. Hoy en día, el TPH alogénico se utiliza para el tratamiento de diversas enfermedades y en muchos casos es considerada como la única opción terapéutica curativa para determinados pacientes. A su vez, las mejoras acontecidas han permitido extender la aplicación de este procedimiento a pacientes que antes no eran considerados candidatos a un TPH debido a diferentes condiciones clínicas que hacían presagiar una mala tolerancia, y que generalmente están asociadas a la edad y a la disfunción de órganos por enfermedades acompañantes.

A pesar de este crecimiento en el número de indicaciones clínicas, el hermano con identidad HLA completa, que es considerado como el donante ideal, está disponible sólo para un 30% de los pacientes que necesitan un TPH. Se hace por tanto necesario el uso de fuentes alternativas de células progenitoras, si se pretende ofrecer este procedimiento al máximo número de candidatos posible. La búsqueda de un donante no emparentado entre los más de siete millones de voluntarios que existen entre los distintos registros sólo tiene éxito en aproximadamente el 50-70% de los casos. Además, en muchas ocasiones, el tiempo requerido para encontrar el donante adecuado puede ser demasiado largo, comprometiendo la realización final del trasplante.

Por las razones señaladas anteriormente, la investigación en el área del TPH alogénico durante los últimos años se ha desarrollado de manera importante en la búsqueda de fuentes alternativas de progenitores hematopoyéticos, entre los que han destacado la médula ósea y la sangre circulante de donantes haploidénticos y la sangre de cordón umbilical de donantes no emparentados. En los últimos años se han puesto en funcionamiento un número importante de bancos públicos para el almacenamiento de sangre de cordón umbilical, que han permitido incrementar de forma notable el número de unidades almacenadas disponibles para proceder al trasplante.

Desde que en 1988 Gluckman et al.(8) realizaran de forma exitosa el primer trasplante de sangre de cordón umbilical en un niño con anemia de Fanconi grave, a partir de células de un donante hermano HLA-idéntico, el número de procedimientos ha ido creciendo de forma exponencial. Este espectacular crecimiento ha tenido su mayor impacto en la población infantil, en la que esta modalidad de trasplante ha ido ganando una gran aceptación y, por tanto, considerado un procedimiento estándar.

Por el contrario, el bajo número de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) contenidas en una unidad de sangre de cordón umbilical en comparación con la médula ósea o la sangre periférica movilizada, así como el mayor peso de los pacientes adultos, ha ralentizado el desarrollo de este procedimiento en pacientes de edad más avanzada, fundamentalmente por las incertidumbres relacionadas con el injerto hematopoyético. Como consecuencia de esto, los primeros trabajos acerca del TSCU-DNE en pacientes adultos se limitaban a un escaso número de series que incluían más de 20 pacientes(10, 11). Estos trabajos mostraron efectivamente que la probabilidad de injerto se quedaba en torno a un 90%, mientras que este injerto sucedía en una mediana de 27 días(10), lo que representaba una cinética de recuperación de la neutropenia sensiblemente peor a la observada con médula ósea o sangre periférica de donante no emparentado. En estos estudios, el número de células nucleadas totales (CNT) emergía como el factor con mayor influencia significativa en el injerto tras TSCU. Aunque la mayoría de los trabajos desarrollados hasta ahora no han demostrado una ventaja clara del TPH-DNE usando fuentes convencionales frente al TSCU, una de las limitaciones más importantes en el desarrollo de este último ha sido la cinética del injerto y la probabilidad de que este no ocurriese, lo que ha conducido al desarrollo de estrategias clínicas para mejorar la recuperación hematopoyética.

El estudio del quimerismo hematopoyético para valorar el porcentaje de células del donante y del receptor es una de las herramientas principales de que se dispone en la actualidad para poder analizar el injerto hematopoyético durante el curso de un trasplante y predecir una probable pérdida del mismo. La mayoría de los estudios de quimerismo se han centrado en trasplantes con acondicionamientos no mieloablativos mediante la realización de estudios seriados. No obstante, existen algunos datos que sugieren que el estado del quimerismo precoz tras el trasplante, analizado en un único punto, podría dar información muy valiosa acerca del futuro del injerto(12).

1.3 CARACTERÍSTICAS DE LA SCU

La evolución de los pacientes que reciben un alo-TPH está influenciada por múltiples variables. Algunas de ellas tienen que ver con el propio paciente, tal y como sucede con el estado clínico del paciente valorado según la escala del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) u otras, la presencia de comorbilidades añadidas, la edad o los antecedentes en el tratamiento y manejo de la enfermedad que motiva el trasplante. Sin embargo, otras de las variables que pueden condicionar el éxito del trasplante radican en las características específicas del inóculo de células

progenitoras. En este sentido es bien conocido que la sangre de cordón umbilical presenta diferencias significativas con otras fuentes de progenitores como pueden ser la médula ósea o la sangre periférica movilizada. La Tabla 1 muestra algunas de las peculiaridades de la sangre de cordón.

Tabla 1. Ventajas e inconvenientes de la sangre de cordón umbilical

Ventajas y Desventajas	Implicaciones Clínicas
Reactividad inmunológica reducida Inmadurez de los linfocitos de cordón y menos células T	Un mayor grado de disparidad HLA es posible Una mayor probabilidad de encontrar un donante válido y por tanto un menor tiempo hasta el trasplante
	Menos riesgo y gravedad de EICH aguda y crónica
Dosis celular baja Menos progenitores hematopoyéticos y células madre	Teóricamente una mayor probabilidad de fallo de injerto (por dosis celular, no por rechazo inmunológico). Retraso en la recuperación hematopoyética.
Baja incidencia de transmisión al feto de infección por CMV y VEB	Bajo riesgo de transmitir infecciones por virus latentes como CMV o VEB al receptor del trasplante
Inóculo almacenado	No hay riesgo de rechazo del donante a la donación
	No existe riesgo para el donante
Posibilidad de enfermedades hereditarias desconocidas	Teóricamente existe el riesgo, aunque remoto, de transmisión de una enfermedad genética

1.3.1. Dosis celular de la SCU

La condición indispensable para poder realizar un TPH es la disponibilidad de un inóculo con un número suficiente de células progenitoras hematopoyéticas. Si bien existen algunas discrepancias a la hora de caracterizar estas CPH, existe un amplio acuerdo en que la presencia de un número adecuado de células CD34+ es suficiente para garantizar un injerto estable. La principal preocupación referente a la SCU en los primeros años en los que se planteó su uso para trasplante fue precisamente el menor contenido total de células progenitoras. De ahí que los experimentos iniciales se centrasen en demostrar su capacidad potencial para regenerar una médula ósea tras un tratamiento mieloablativo.

La SCU es un tejido de origen humano que normalmente se desecha tras el parto. Corresponde a parte de la sangre fetal que queda retenida en la placenta y cordón umbilical una vez se produce la ligadura de este último tras el alumbramiento. El motivo de plantearse el uso de la SCU como posible fuente de progenitores para el TPH radica en los estudios realizados sobre la sangre fetal durante el periodo de gestación. A lo largo de ésta, los núcleos principales de la hematopoyesis van cambiando de ubicación en el feto, lo que obliga a que exista un proceso de continua movilización de progenitores hematopoyéticos para favorecer los nuevos implantes. En torno a las 10 semanas de edad, un 5,1% de células mononucleadas en sangre periférica expresan el antígeno CD34+, que ha sido ampliamente utilizado para definir poblaciones celulares con capacidad de injerto. Estas células mononucleadas son capaces de dar lugar a progenitores de todos los linajes hematopoyéticos cuando son sembradas en cultivos clonogénicos (CFU-GEMM, BFU-E y CFU-GM)(13). Uno de los datos más llamativos de estas células es su capacidad para dar lugar a un elevado número de células de todos los linajes hematopoyéticos cuando se expanden *ex vivo*. Si bien el porcentaje de células con marcaje CD34+ sobre las células mononucleadas disminuye a lo largo de la gestación, su concentración por unidad de volumen se mantiene y su capacidad clonogénica es similar. Se puede por tanto afirmar que en la vida fetal existe un estado de movilización continua de CPH que facilita la repoblación de los distintos nichos hematopoyéticos(14). Este estado de movilización de CPH en la sangre fetal se mantiene hasta el nacimiento. Tras este momento comienza una reducción brusca del porcentaje de células CD34+ circulantes. A las 24 horas después del nacimiento, este descenso puede suponer hasta un 70% de las células CD34+ circulantes en la sangre fetal y su cifra sería prácticamente similar a la de la sangre

adulta a la semana del nacimiento(15). La sangre de cordón obtenida en el momento del nacimiento tras la ligadura del cordón umbilical suele tener en torno a 80 mL de volumen. Sus principales valores promedio son un hematocrito de 49%, hemoglobina de 15,3 g/dL y cifra de leucocitos de $16,2 \times 10^9/L$. Aproximadamente un 0,30% de las células nucleadas son CD34+. Aunque normalmente se le ha otorgado menos importancia, puede existir una contaminación por células de la madre por la comunicación feto-materna que tiene lugar durante el parto y que se ha podido comprobar mediante la identificación de ADN materno en hasta un 30% de las unidades de SCU(16, 17). Estos datos obtenidos a partir del análisis de la sangre fetal son los que impulsaron a distintos investigadores a considerar la SCU como un tejido potencialmente apto para el trasplante de progenitores hematopoyéticos. A principios de los años 80 los datos principales de los que se disponía pueden resumirse en los siguientes puntos: 1. Confirmación de la presencia de diferentes tipos de CPH en la SCU; 2. La siembra de las células mononucleadas de la SCU en cultivos clonogénicos daba lugar a CPH de todos los linajes hematopoyéticos; 3. Las CPH obtenidas a partir de la sangre de cordón umbilical podían ser expandidas *ex vivo* incrementando de forma significativa su número(18, 19).

Tras el análisis de una gran cantidad de muestras de SCU Broxmeyer et al.(19) llegaron a la conclusión de que la sangre recogida de una única unidad de cordón tenía un número adecuado de CFU-GM, BFU-E y CFU-GEMM con una gran capacidad proliferativa que superaba a la de la médula ósea y la sangre periférica movilizada(19). Obviamente, la disponibilidad de la sangre periférica en términos de volumen potencialmente recolectable es mucho mayor que la de la SCU, en la que el volumen de cada unidad está limitado a la cantidad de sangre que puede ser recogida tras la ligadura del cordón umbilical y que se sitúa en torno a 80 mL. Aún así, la cifra de progenitores en SCU se encontraba en el rango inferior que había permitido una reconstitución hematopoyética satisfactoria en TPH previos. La criopreservación de estas unidades de SCU y su posterior descongelación para el trasplante requería que no se realizase separación celular alguna para mantener un número adecuado de progenitores al momento del trasplante y evitar una pérdida significativa de los mismos. Los primeros trasplantes de sangre de cordón umbilical se llevaron a cabo de esta manera a partir de inóculos HLA-idénticos criopreservados en el laboratorio de Broxmeyer et al. Estos trasplantes se realizaron bajo la asunción de que la SCU tenía suficientes CPH aunque su número fuese bajo, ya que había una proporción significativa de las mismas con gran capacidad proliferativa, existía una clara

capacidad de expandir ex-vivo estas CPH y de regenerar la médula de ratones tratados con dosis letales de radioterapia(19, 20).

El primer TSCU se realiza en un niño con anemia de Fanconi en 1988 a partir del cordón umbilical criopreservado de su hermana HLA-idéntica(8) y da paso a la implantación de este procedimiento en niños de forma muy rápida y a la creación de bancos de SCU que aumentan la disponibilidad de esta fuente de progenitores hematopoyéticos. En 1996 se publican los resultados del primer TSCU de DNE en adultos, demostrando que el procedimiento es factible en pacientes con un peso más alto(9, 21). Los primeros estudios comparativos, generalmente basados en análisis de caso-control pareados, ponen de manifiesto que la recuperación hematopoyética es más lenta y la probabilidad de injerto menor en pacientes trasplantados a partir de SCU frente a médula ósea (22-25). En la Tabla 2. Primeros estudios de TSCU en adultos se muestran los resultados de algunos de los trabajos pioneros en TSCU en pacientes adultos.

Tabla 2. Primeros estudios de TSCU en adultos

Características	Laughlin N = 68	Sanz N = 22
Edad mediana en años (extremos)	31 (18–58)	29 (18–46)
Mediana de peso en kg (extremos)	69 (41–116)	70 (41–85)
Serología positiva para CMV	41 (60%)	17 (77%)
Pacientes sin hemopatías malignas	11	0
Enfermedades Malignas		
LMA/LLA	15/19	6/3
LMC	15	12
SMD	3	1
Otros	4	0
Estadio de la enfermedad		
Riesgo estándar	4	6
Alto riesgo	50	16
Disparidad HLA		
Donantes idénticos	2 (3%)	1 (5%)
Una o dos disparidades	55 (80%)	21 (95%)
Tres disparidades	11 (16%)	0

Tabla 3 bis. Primeros estudios de TSCU en adultos

Características	Laughlin N = 68	Sanz N = 22
Mediana de dosis celular (extremos)		
CNT antes de la congelación ($\times 10^7$ /kg)	2.1 (1–6.3)	2.5 (1.5–6.9)
CNT infundidas ($\times 10^7$ /kg)	1.6 (0.6–4)	1.7 (1–5)
Células CD34+ infundidas ($\times 10^5$ /kg)	1.2 (0.2–16.7)	0.8 (0.3–2.6)
CFU-GM infundidas ($\times 10^4$ /kg)	1.2 (0–25.4)	1.8 (0.05–10.8)
Régimen de acondicionamiento		
Basado en TBI + ATG	51	0
Basado en BU + ATG	14	0
TT+BU+CY+ATG	0	21
FLU+TT+ATG	0	1
Otros	3	0
G-CSF	Sí	Sí
Profilaxis de la EICH		
CsA or CsA + prednisona	68	22
No injerto/evaluable	5/60 (8%)	0/20* (0%)
Probabilidad de injerto mieloide al día 60	90%	100%
Mediana de días a PMN $\geq 0.5 \times 10^9$/l	27 (13–59)	22 (13–52)
Probabilidad de injerto plaquetar al día 180	NA	100%
Mediana de días a plaquetas $\geq 20 \times 10^9$/l	58 (35–142)	69 (49–153)
EICH aguda		
Grado \geq II	22	16
Grado III–IV	11	7
EICH crónica/Pacientes en riesgo		
Limitado	11	4
Extenso	1	5
MRT a día 100	51%	43%
Probabilidad de SLE	26% (40 me.)	53% (12 me.)

*Un paciente desarrolló fallo de injerto secundario.

Estos mismos datos se confirman en sendos trabajos en los que se compara SCU de donante no emparentado frente a otras fuentes de PH en pacientes adultos(26, 27). En ambos casos se concluye que el tiempo necesario hasta injerto es significativamente mayor en pacientes trasplantados con SCU.

Aunque todos estos datos confirman que la SCU es una fuente de progenitores adecuada para el TPH alogénico, parece evidente que tanto la reconstitución hematopoyética como la reconstitución inmune van a suceder con una cinética y unas tasas finales de éxito algo menor que las observadas con médula ósea o sangre periférica movilizada. La mejora de estos aspectos, bien mediante la aplicación de manipulaciones *ex vivo*, como la expansión para incrementar el número de progenitores disponibles, el uso de dos unidades de cordón umbilical o de una tercera fuente hematopoyética para la obtención de injertos transitorios que reduzcan el tiempo de neutropenia, son opciones que han parecido atractivas y que están actualmente bajo investigación.

1.3.2. Compatibilidad HLA en TSCU

Una de las características más importantes de la SCU y que facilita su rápida disponibilidad es la posibilidad de utilizar unidades que no tengan una identidad HLA completa para los 6 antígenos principales (HLA-A, B y DR). Algunas de las características distintivas de la SCU explican este hecho, entre las que se incluyen una relativa inmadurez de los linfocitos de cordón así como unos progenitores hematopoyéticos con capacidad de producción de factores de crecimiento autocrinos y una larga longitud en sus telómeros(28, 29).

En los pacientes que reciben un trasplante alogénico la incidencia de EICH se incrementa conforme aumenta el grado de disparidad HLA entre donante y receptor. Este hecho también parece observarse en el TSCU pero el grado de EICH para un mismo grado de disparidad es claramente menor en el TSCU que en el trasplante a partir de otras fuentes, tanto si nos referimos a la EICH aguda como a la crónica. Son muchos los trabajos en los que se ha comprobado que la incidencia de EICH grado II-IV y III-IV en pacientes trasplantados de SCU sin identidad HLA oscila entre 30%-50% y 10%-20%, respectivamente(23, 30-34). Rubinstein et al.(30) demostraron en una de las primeras grandes series una tasa de EICH aguda grave (grado III-IV) en torno al 23% y de EICH crónico del 25% a pesar de que más de un 90% de los trasplantes se realizaron con incompatibilidad en los principales antígenos del sistema HLA, generalmente con 4-5 identidades sobre 6.

En un interesante estudio(23) en el que se comparó la evolución de niños sometidos a TSCU o a TMO, en ambos casos de hermanos HLA-idénticos, la incidencia acumulada de EICH aguda de grado II-IV (14% vs. 24%; $P = .02$) y EICH crónica (5% vs. 14%; $P = .02$) fueron sensiblemente menores en el caso del TSCU, aún cuando el número de pacientes que recibió metotrexate en este grupo fue significativamente menor. De la misma manera, la gravedad de la EICH fue menor en el grupo de pacientes trasplantados con SCU sin que ninguno de ellos presentara EICH grado IV. Por tanto, el uso de SCU permite un grado mayor de disparidad HLA sin que esto se traduzca en más EICH aguda ni crónica. Este hecho hace que la búsqueda de una unidad de cordón umbilical adecuada para el trasplante sea más fácil y rápida. De hecho, el tiempo requerido para encontrar un donante no emparentado es menor en el caso de la SCU que de la médula ósea HLA-idéntica (14 días vs. 49 días, respectivamente), lo que reduce el tiempo a trasplante(35). Este aspecto es importante en el caso de pacientes que necesiten un TPH urgente. A su vez, a la hora de seleccionar una unidad de SCU podemos optar por un mayor número de células en detrimento de una identidad HLA completa.

1.4 RESULTADOS CLÍNICOS DEL TSCU

1.4.1. Desarrollo inicial del TSCU en el Hospital Universitario La Fe

El número de TSCU se ha ido incrementando en los últimos años hasta convertirse en un estándar en el tratamiento de niños y en una práctica cada vez más extendida en el caso de pacientes adultos. Lo que hoy no se puede negar es que el uso de la SCU ha permitido encontrar un donante de CPH para la mayoría de pacientes que necesitan un trasplante y carecen de un hermano o un donante no emparentado HLA-idénticos(36). Cuando nuestro grupo comenzó con el programa de TSCU en pacientes adultos en 1997, los primeros trabajos de TSCU publicados en adultos correspondían a colaboraciones entre distintos centros o estudios de registros, con variaciones importantes en los esquemas de acondicionamiento y profilaxis de la EICH utilizados(10, 30, 31). O por el contrario, se trataba de series muy pequeñas o casos clínicos aislados.

El primer objetivo de nuestro programa de TSCU fue tener datos concretos sobre la eficacia y seguridad del procedimiento en pacientes acondicionados de forma homogénea, tratados con la misma profilaxis de la EICH y trasplantados con unidades de SCU seleccionadas de acuerdo a criterios uniformes. Entre mayo de 1997 y diciembre de 2000, se trasplantaron 22 pacientes adultos con hemopatías malignas de

acuerdo a los criterios estándares de selección para TPH alogénico, siempre que careciesen de un donante hermano HLA-idéntico, un donante familiar con una disparidad como máximo o un donante no emparentado localizado en búsqueda en los registros internacionales a tiempo para el trasplante. La unidad de SCU debía ser compatible al menos en 4 de los 6 antígenos HLA estudiados (clase I A y B por baja resolución y clase II DRB1 por alta resolución) y debía contener un mínimo de 1×10^7 CNT por kg de peso del receptor.

En este primer trabajo, de un total de 22 pacientes, 2 pacientes fallecieron antes del día +28 sin poder ser evaluables para injerto. Los restantes 20 pacientes alcanzaron un injerto mieloide en una mediana de 22 días (extremos 13 – 52) para una cifra de $0,5 \times 10^9/L$ neutrófilos y de 26 días (extremos 14 – 64) para una cifra de $1 \times 10^9/L$ neutrófilos. La probabilidad acumulada de injerto mieloide a los 60 días fue del 100%. La mayoría de pacientes de esta serie desarrolló EICH aguda en distintos grados.

En estudios contemporáneos a esta primera serie la probabilidad actuarial de injerto fue del 90%, pero el tiempo hasta la recuperación de la neutropenia fue sensiblemente mayor, situándose la mediana en 27 días (extremos, 13 – 59)(10). Aunque las razones de este hecho no están claras, diferencias en la intensidad del acondicionamiento o el uso de globulina antitimocítica (ATG), así como la administración programada de G-CSF postrasplante podrían explicarlo. En todo caso, estos primeros trabajos confirmaban una cinética de injerto más lenta con SCU que con otras fuentes de CPH, con una influencia muy importante de la dosis celular, lo que obligaría a tenerla en cuenta incluso por encima del grado de disparidad HLA.

En nuestra serie, la supervivencia libre de enfermedad se situaba en un 53% al año de seguimiento, con un marcado impacto de la edad en la misma. Los pacientes con estadios menos avanzados de su enfermedad tuvieron una mejor supervivencia pero fueron aquellos que recibieron el trasplante con una edad igual o inferior a 30 años los que más se beneficiaron del procedimiento, con una probabilidad de supervivencia libre de enfermedad al año del 73%. La mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) fue alta, con una probabilidad del 43% a los 100 días, siendo la limitación más importante del procedimiento.

Tras este primer trabajo, el TSCU se instauró como un tratamiento perfectamente válido en nuestro centro con más de 200 trasplantes con acondicionamiento mieloablativo realizados. Algunos de estos trabajos incluyeron pacientes con LMC(37) con cifras de supervivencia libre de enfermedad (SLE) de 41%

a los 8 años y pacientes con leucemias agudas de alto riesgo(38) son SLE de 42% a los dos años. En ambos casos la recuperación hematopoyética se produjo con una mediana superior a los 20 días y la probabilidad de injerto fue incluso del 88%, indicando que esta es un área susceptible de mejoras importantes.

1.4.2. Estudios comparativos en TSCU

A principios de los años 2000, si bien los datos iniciales de las primeras series de TSCU sugieren que no hay grandes diferencias en términos de supervivencia libre de enfermedad con respecto a la médula ósea no emparentada, la mortalidad relacionada con el procedimiento es muy alta probablemente en relación con una gran cantidad de factores entre los que se encuentra el pronóstico de la enfermedad de los pacientes trasplantados. En ese momento las ventajas logísticas de la SCU son claras, con una disponibilidad muy alta en comparación a otras fuentes de progenitores de donante no emparentado por lo que empieza a darse la situación de disponer de una unidad para trasplante cuando aún no ha aparecido ningún otro donante en pacientes en los que el TPH es relativamente urgente. Esto hace necesario disponer de datos comparativos, por lo que se empiezan a publicar los primeros trabajos comparando el TSCU con el TPH de médula ósea o sangre periférica movilizada.

Estos primeros estudios comparativos se basan en su mayoría, en datos retrospectivos y análisis pareados en busca de información que permita ubicar a la SCU en el lugar apropiado dentro del algoritmo de búsqueda de donantes alternativos, cuando no existe un hermano HLA-idéntico disponible(22, 24, 25). Dos de estos estudios se llevan a cabo en niños y el tercero en pacientes adultos. Las principales conclusiones que se pueden extraer de los mismos es que el injerto es bastante más lento con SCU que con el resto de fuentes sin que se aprecie, sin embargo, una probabilidad de alcanzar dicho injerto que sea estadísticamente menor a largo plazo. Obviamente, los trasplantes realizados a partir de SCU, tenían en su mayor parte al menos una incompatibilidad HLA y a pesar de ello, la incidencia de EICH de grado mayor o igual a 2 no fue más alta en comparación con la médula no sometida a depleción T y en algunas series, parecía incluso menor.

Los trabajos pediátricos compararon el TSCU con el trasplante de médula ósea con depleción T y con el trasplante de médula ósea no manipulada(22, 24). Los datos obtenidos ponían de manifiesto que los TSCU eran trasplantes sin identidad HLA en la mayoría de los casos, algo que prácticamente no sucedía en los trasplantes de MO. El número de CNT infundidas en el caso de la SCU fue significativamente menor que en

la MO no deplecionada, pero no mucho menor que en la MO con depleción T. Como ya se había observado en estudios previos y era esperable, el injerto mieloide era bastante más tardío que en el TMO-DNE (29 días vs. 22 días) o el TMO-DNE con depleción T (27 días vs. 14 días), lo que va dejando claro que los días de neutropenia tras TSCU van a ser mayores y por tanto mayor el riesgo de complicaciones.

El otro de los trabajos pediátricos(24) es un estudio de registro con las consiguientes limitaciones derivadas de la heterogeneidad en los esquemas de acondicionamiento, profilaxis de la EICH y otros procedimientos. La diferencia principal en este caso es que, al margen del retraso esperable en la recuperación hematopoyética y una menor incidencia de EICH de grado II o superior, los pacientes que recibieron un TSCU experimentaron una mortalidad precoz (antes de los 100 días) significativamente mayor que aquellos que recibieron un TMO no manipulado. Y es que la mortalidad antes del día +100 en esta serie era del 39% en los pacientes con TSCU. Es posible que en el trabajo de Baker et al.(24) no se apreciaran diferencias significativas debido al tamaño muestral, a pesar de que la mortalidad al día 100 era mayor en el TSCU, pero esas cifras eran bastante más bajas que en la serie de Rocha et al.(22). De todas formas, la ausencia de un ensayo clínico aleatorizado limita la extracción de conclusiones altamente fiables.

Dado que la incidencia de EICH en estas series no era más alta con el uso de SCU a pesar de un mayor grado de disparidad, este exceso de mortalidad precoz podía estar influenciado por unas características claramente peores en lo que a cinética del injerto se refiere, que podría resultar en un mayor número de infecciones durante la neutropenia. En este sentido, nuestro grupo observó en pacientes adultos, que el 100% de los mismos desarrollaba al menos un episodio infeccioso en la etapa precoz del trasplante y que éste era la causa directa o indirecta de la muerte en un 30% de los pacientes(39). Esto pone de manifiesto la importancia de conocer a fondo, y mejorar la cinética del injerto en el TSCU.

En 2007, Eapen et al.(32) publican un estudio en niños que recibieron un TSCU o un TMO-DNE para el tratamiento de su leucemia aguda. Con un número importante de pacientes (503 pacientes habían recibido un TSCU y 282 un TMO-DNE) no se observaron diferencias significativas en la SLE entre el TSCU con incompatibilidades HLA o la médula ósea idéntica en 8 de 8 antígenos. Sin embargo, dentro del TSCU parece que los pacientes con 2 disparidades o aquellos con 1 disparidad y baja celularidad tenían una mortalidad precoz mayor.

Los trabajos comparativos en adultos incluyendo un número significativo de pacientes no llegan hasta finales de 2004 por parte del Center for International Blood and Marrow Transplant Research, el European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) y el grupo de la Universidad de Tokyo(40). Los dos primeros, son estudios de registro cuyos resultados se publican simultáneamente en el mismo número de la revista New England Journal of Medicine junto con una editorial al respecto (26, 27, 41). Aunque las conclusiones de ambos trabajos van en la misma dirección, la de reconocer a la SCU como una alternativa válida en pacientes que no dispongan de un donante HLA idéntico, se aprecian algunas diferencias destacables en los resultados.

El estudio del grupo americano incluye pacientes que reciben un TMO-DNE con una disparidad antigénica. Los pacientes que reciben un TSCU tienen una recuperación hematopoyética, tanto de neutrófilos como de plaquetas, bastante más lenta que en los pacientes que reciben un TMO. Aunque la probabilidad de injerto es similar a la de la MO con una disparidad, ésta es significativamente menor que la observada con MO idéntica. Es decir, los pacientes que reciben un TSCU tienen una tasa de fallo de injerto mayor.

Algo similar sucede con la mortalidad relacionada con el trasplante y la SLE. Aunque los resultados son similares a la MO no idéntica, la MRT es mayor en el TSCU que en la MO idéntica y la SLE es menor. Sin que existan diferencias con la MO no idéntica, la MRT al día 100 sí que fue mayor en el TSCU que en la MO idéntica y la mortalidad por infecciones durante ese periodo también fue más alta en el TSCU que en la MO en general. Al final, los resultados del TSCU, con disparidades HLA en todos los casos, eran más parecidos a los de la MO con una disparidad HLA que a la MO idéntica.

En el caso del estudio del EBMT, sólo se incluyeron pacientes que habían recibido un TMO a partir de donantes no emparentados idénticos, mientras que el 94% de los TSCU presentaban alguna disparidad en el sistema HLA. De nuevo, la cinética de la recuperación hematopoyética fue más lenta y la probabilidad de fallo de injerto mayor con el uso de TSCU. Sólo 4 pacientes de los 20 que experimentaron un fallo de injerto sobrevivieron al mismo, lo que pone de manifiesto la gravedad de esta complicación. Aunque un poco más alta en el TSCU, las diferencias en la MRT no fueron significativas, con más muertes por toxicidad en el TSCU y más por EICH en la MO. En el análisis multivariante la supervivencia global y la SLE no fueron estadísticamente diferentes entre ambos grupos.

El grupo Japonés, en una serie de una única institución, concluye que los resultados del TSCU-DNE son incluso mejores que aquellos obtenidos con trasplantes de médula ósea o sangre periférica de donantes familiares(40). Estos buenos resultados no han podido ser reproducidos en series de pacientes que no sean japoneses.

Mucho más reciente es el estudio combinado de Eurocord y el IBMTR(42), en el que se compara el TSCU con incompatibilidades HLA frente a la MO con o sin disparidad y la sangre periférica movilizada con G-CSF, todo ello en donantes no emparentados. Aunque de nuevo la MRT es mayor en el TSCU, ésta se compensa con una menor tasa de recidivas y EICH, lo que conduce a supervivencias libres de enfermedad que son comparables entre todas las fuentes. En la Tabla 4 se muestran los resultados de los principales estudios comparativos.

Tabla 4. Estudios comparativos entre TSCU y médula ósea

Características	Eapen [†]			Takahashi [‡]	
	TSCU	MO-DNE	CPSP	TSCU	HLA-id
Número de Pacientes	165	472	888	100	71
Tipo de Pacientes	Adultos	Adultos	Adultos	Adultos	Adultos
Disparidad HLA	94% [¶]	30% [¶]	29% [¶]	100% [¶]	24% [¶]
CNT infundida ×10⁸/kg	0,26	-	-	0,24 [¶]	3,3 [¶]
Uso de ATG	72% [¶]	28% [¶]	18% [¶]	-	-
Tasa de Injerto	-	-	-	91% [¶]	97% [¶]
Probabilidad de Injerto	80% [¶]	93% [¶]	96% [¶]	-	-
Días recuperación PMN	24 [¶]	19 [¶]	14 [¶]	-	-
Días recuperación PQ	52 [¶]	28 [¶]	19 [¶]	-	-
EICH aguda	30% [¶]	41% [¶]	49% [¶]	7% ^{¶*}	19% ^{¶*}
EICH crónica extensa	24% [¶]	39% [¶]	50% [¶]	22% [*]	44% [*]
MRT	33% [¶]	26% [¶]	27% [¶]	8%	4%
SLR a los dos años	33%	39%	34%	70%	60%

[†] Diferencias significativas en edad.

[‡] Diferencias significativas en peso.

[¶] Diferencias estadísticamente significativas.

*EICH aguda grado III-IV y EICH crónica extensa.

1.4.3. Nuevas tendencias en TSCU

Como hemos visto, todos los trabajos coinciden en otorgar al TSCU carencias importantes en la cinética de injerto y en la probabilidad final del mismo en pacientes adultos, debido al número inferior de progenitores hematopoyéticos contenidos en una unidad de SCU. Esto parece traducirse en muchos casos en una mayor mortalidad precoz, fundamentalmente por infecciones, lo que puede estar en relación con los periodos tan prolongados de neutropenia. La mortalidad entre los pacientes que no alcanzan injerto es muy alta, poniendo de manifiesto que se trata de una complicación extremadamente grave. Por ello, la investigación en el campo del injerto

hematopoyético tras TSCU es probablemente el área más importante en la que se puede actuar para mejorar los resultados de este procedimiento.

Varias alternativas clínicas han sido puestas en marcha para superar esta limitación relativa al injerto y destinadas fundamentalmente a incrementar el número de células progenitoras infundidas. Entre ellas destacan la infusión de varias unidades parcialmente compatibles de SCU (43-53), la infusión intraósea de la SCU (54, 55), el uso de células CD34+ purificadas de un tercer donante haploidéntico, que reduzcan la neutropenia transitoriamente hasta el injerto de la unidad de SCU definitiva (56, 57) o la infusión de células expandidas *ex vivo*(58). Según datos de Eurocord, más de 900 trasplantes se han llevado a cabo con dos unidades de SCU. Al parecer, la tasa de fallos de injerto no difiere entre las dos estrategias, aunque en el caso del uso de dos unidades se ha observado una mayor incidencia de EICH grado II de aparición más precoz y una menor tasa de recidiva de la enfermedad, sin que la MRT sea superior a la observada con una única unidad de cordón (59). La eficacia real de estas estrategias está aún por determinar.

En el presente trabajo se pretenden investigar los factores que se asocian a una mayor tasa de fallo de injerto y una recuperación hematopoyética más lenta y, fundamentalmente, determinar la capacidad de los estudios de quimerismo hematopoyético en fase precoz para predecir como se va a comportar la cinética de injerto tras TSCU.

1.5 QUIMERISMO HEMATOPOYÉTICO

El quimerismo hematopoyético se ha convertido en una herramienta de gran importancia para el estudio peritrasplante del injerto hematopoyético. En situaciones especiales, como los trasplantes con manipulación del inóculo (depleción linfoide T) o el uso de acondicionamientos no mieloablativos, en los que es frecuente la presencia de una quimera mixta, se puede requerir del uso de inmunoterapia, mediante la infusión de linfocitos del donante, para revertir esa quimera mixta y evitar el rechazo o pérdida del injerto, así como la anticipación de la recidiva de la enfermedad en trasplantes por hemopatías malignas.

1.5.1. Definición de quimerismo hematopoyético

El término quimera hace referencia a un monstruo imaginario de la mitología griega que está compuesto por una cabeza de león, un cuerpo de cabra y una cola de

dragón. Con su habilidad para vomitar fuego tuvo aterrorizado a la población de Lycia, hasta que fue abatido por el viejo héroe Bellophoron. La incorporación de esta terminología en medicina la realizó Ford en 1956(60), cuando básicamente viene a describir que una quimera es un organismo cuyas células derivan al menos de dos o más cigotos. Esta definición es especialmente clara en el campo del trasplante, donde rápidamente empieza a utilizarse para realizar el seguimiento del injerto tras TPH y estimar el riesgo de recidiva de un paciente en el caso de enfermedades neoplásicas. Básicamente, lo que se realiza es una identificación de marcadores del donante y receptor. Esto permite saber en que proporción están representados ambos en el sistema hematopoyético del recipiente del trasplante e intentar cuantificar ambos sistemas para saber que ventajas e inconvenientes presenta la situación actual y decidir si es necesario actuar clínicamente.

El quimerismo hematopoyético puede ser:

1. Completo: Toda la celularidad observada pertenece al donante.
2. Mixto: Existe una coexistencia entre celularidad del donante y del receptor en todas las líneas. El quimerismo mixto se divide en:
 - a. Descendente: En diversos estudios se aprecia un incremento de la celularidad del receptor y un descenso de la del donante.
 - b. Estable: No hay cambios en el porcentaje entre material del donante y del receptor.
 - c. Ascendente: El material del donante se incrementa al menos un 5% entre los diferentes estudios.
3. Quimerismo 'split': Existe una quimera completa del donante salvo en alguna serie en la que la quimera es de recuperación autóloga.
4. Recuperación autóloga: Presencia sólo de material hemopoyético del receptor

1.5.2. Métodos para el estudio del quimerismo hematopoyético

Desde el inicio de los estudios de quimerismo muchos métodos se han ido desarrollando, basándose todos en el principio básico de diferenciar entre los distintos marcadores genéticos polimórficos y sus productos. Estos métodos incluyen citogenética (61, 62), fenotipaje de células rojas (63, 64), análisis de restricción de fragmentos de polimorfismos(65, 66) y fluorescencia con hibridación in situ (FISH) de

cromosomas sexuales (67-72). Todas estas iniciativas tienen en común el hecho de que se tratan de procedimientos técnicamente costosos y que no permiten obtener resultados para todos los pacientes. Por lo tanto, podemos decir que la revolución en los métodos para los estudios de quimerismo llega de la aplicación de la reacción en cadena a la polimerasa (PCR) a este ámbito (73-77). Los primeros trabajos se centran en el estudio de la amplificación de regiones con un número variable de repeticiones en tándem (VNTR), o bien en la caracterización de este número de repeticiones en tándem o 'short tándem repeat' (STR), realizando habitualmente las lecturas en geles de acrilamida, con las limitaciones que supone en términos de resolución y cuantificación de los resultados, algo que es imprescindible en todos los estudios de quimerismo.

El uso de marcadores fluorescentes para etiquetar los distintos cebadores de los STR que van a ser analizados y la resolución de la PCR utilizando técnicas de electroforesis capilar, permite finalmente una cuantificación muy eficiente del grado de quimerismo mixto, es decir, cuanto material pertenece al donante y cuanto al receptor(76, 78-81). Estas PCR semiautomatizadas permiten estudiar un mayor número de muestras y en distintas etapas del trasplante. Fundamentalmente permiten estudios también en fases precoces y se acaban convirtiendo en las técnicas más empleadas para los estudios de quimerismo en el área del trasplante hematopoyético(82).

Las distintas técnicas tienen entre sí diferencias muy importantes en términos fundamentalmente de sensibilidad y especificidad, así como en la complejidad que se requiere para llevarlas a cabo. Dos son los objetivos fundamentales de los estudios de quimerismo hematopoyético: 1) El seguimiento del injerto tras el TPH con el fin de poder anticipar si éste va a sufrir problemas o incluso si puede perderse. Esto es muy típico en trasplantes con acondicionamientos no mieloablativos o con manipulaciones del inóculo como depleción T y afecta especialmente a enfermedades no malignas. 2) El segundo aspecto es el de poder anticipar la recidiva de un paciente trasplantado por una hemopatía maligna. En este caso la respuesta no está tan clara y entran en juego otras variables, como los propios métodos de seguimiento de la enfermedad mínima residual (EMR) para cada una de las enfermedades. Para dar respuesta a este apartado, los estudios de quimerismo deben disponer de técnicas mucho más sensibles, cuantificables y que permitan un seguimiento seriado de lo que está ocurriendo. Para ello algunos autores disponen de un set de 11 polimorfismos de un solo nucleótido bialélico para ser estudiados con PCR en tiempo real y con un límite de detección inferior al 0,1%(83-85). Dado que ni estas técnicas ni sus aplicaciones

forman la base del presente estudio, obviaremos las limitaciones principales que presentan con respecto a la otra metodología.

1.5.3. Quimerismo hematopoyético e injerto

El TPH es la única opción curativa para un amplio número de enfermedades, tanto malignas como no malignas. En muchos de estos casos, para evitar la toxicidad derivada de los acondicionamientos mieloablativos convencionales se utilizan acondicionamientos de intensidad reducida, por lo que es más frecuente encontrarse con quimerismos mixtos tras el trasplante(86). Por este motivo, en estos enfermos, el rechazo del injerto es una de las complicaciones más importantes y una de las causas más frecuentes de fracaso del trasplante. Un desarrollo rápido de quimerismo completo en células NK o T, parece que puede jugar un papel importante en la presencia de un injerto prolongado cuando se usa acondicionamiento de intensidad reducida(12, 87-89). Muchos de estos estudios se han llevado a cabo mediante determinaciones seriadas en poblaciones celulares separadas o seleccionadas, estableciendo una relación entre el comportamiento ascendente o descendente del quimerismo y el inicio de los fenómenos inmunológicos clínicos tras el trasplante, como EICH, recidiva o pérdida del injerto. De este modo, estudios realizados en pacientes con hemoglobinopatías, con determinaciones del quimerismo realizadas a los 2 , 6 y 12 meses, han mostrado que todos los pacientes que desarrollaban un quimerismo con menos del 30% del receptor finalmente perdían el injerto, algo que pudieron comprobar en un segundo trabajo con valores de quimerismo mixto muy similares(90, 91). Es decir, en el curso de un trasplante con acondicionamiento de intensidad reducida, el quimerismo puede anticipar un posible rechazo del injerto y facilitar la puesta en marcha de medidas como la infusión de linfocitos del donante si ésta es posible.

Resulta muy interesante el estudio de Dubovsky et al.(12), en tanto en cuanto ofrece la posibilidad de anticipar un fallo de injerto o una cinética de recuperación especialmente lenta, desde una fase muy precoz del trasplante. En este estudio pudieron comprobar que al injerto propiamente dicho le antecedía una etapa de “injerto molecular”, que era prácticamente observable en todos los pacientes que posteriormente injertaban con normalidad. Sin embargo, en los pocos pacientes en que este “injerto molecular” no aparecía no se observaba con posterioridad el prendimiento hematopoyético. Aunque en este caso se trata de trasplantes de médula ósea o sangre periférica, sería interesante analizar si el quimerismo determinado en un

único punto precoz tras el TSCU (día +14) puede anticipar un injerto adecuado, excesivamente lento o incluso un fallo de injerto y este constituye el objetivo principal de este trabajo.

2. HIPÓTESIS

La presencia de un estado de quimerismo mixto en celularidad nucleada total de médula ósea, determinado en el día 14 post-trasplante de sangre de cordón umbilical de donante no emparentado, puede predecir la cinética del injerto hematopoyético así como las tasas de fallo primario de injerto. Esta asociación con la cinética del injerto sería independiente de la dosis celular infundida y afectaría tanto a la serie mieloide como a la serie plaquetar.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS PRIMARIOS

1. Determinar la asociación entre el estado del quimerismo hematopoyético en el día 14 tras TSCU y la probabilidad de fallo primario de injerto.
2. Determinar la asociación entre el estado del quimerismo hematopoyético en el día 14 tras TSCU y la cinética del injerto mieloide.
3. Determinar la asociación entre el estado del quimerismo hematopoyético en el día 14 tras TSCU y la cinética del injerto plaquetar.

3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Determinar la asociación entre la dosis celular infundida y los distintos parámetros de injerto hematopoyético.
2. Determinar la asociación entre el estado del quimerismo hematopoyético en el día 14 tras TSCU y la incidencia de enfermedad del injerto contra el huésped.
3. Determinar la asociación entre el estado del quimerismo hematopoyético en el día 14 tras TSCU y la mortalidad relacionada con el procedimiento.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 SELECCIÓN Y TRATAMIENTO DE PACIENTES

4.1.1. Criterios de inclusión

Los pacientes fueron incluidos en el estudio siempre que cumplieren al menos los siguientes criterios:

1. Enfermedad hematológica maligna como indicación responsable del trasplante.
2. El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos es considerado la mejor opción terapéutica.
3. No disponibilidad de un hermano o familiar HLA idéntico o con una única disparidad en los antígenos HLA.
4. Disponibilidad de al menos una unidad de sangre de cordón umbilical que cumpliera los siguientes dos criterios:
 - a. Al menos una dosis celular de $1,5 \times 10^7$ CNT por kilogramo de peso del receptor y $0,5 \times 10^5$ células CD34+ por kilogramo de peso del receptor. Si las células CD34+ eran menores de $0,5 \times 10^5$ células CD34+ por kilogramo de peso del receptor las CNT debían ser al menos de 2×10^7 CNT por kilogramo de peso del receptor;
 - b. Una identidad mínima de 4 antígenos HLA sobre los 6 estudiados. Los antígenos de clase I A y B se estudiaban por métodos serológicos o por tipaje de ADN de baja resolución, mientras que el antígeno de clase II DRB1 se determinaba por tipaje de ADN de alta resolución.

Conforme el grupo iba ganando experiencia en el TSCU, los criterios de selección de la unidad se fueron cambiando en lo que se refiere a la dosis celular, requiriéndose que fuese mayor a 2×10^7 CNT y 1×10^5 CD34+ por kilogramo de peso del receptor. A partir de 2007 las dosis celulares mínimas exigidas son de 150×10^7 CNT y 70×10^5 CD34+ como dosis total, es decir, con independencia del peso del receptor.

5. Consentimiento informado para el trasplante y los procedimientos necesarios para su realización.

4.1.2. Búsqueda y selección de la unidad de cordón

La búsqueda de las unidades de cordón se llevó a cabo a través del Registro Español de Donantes de Médula Ósea en base a una compatibilidad entre 4 y 6 antígenos con el recipiente y siguiendo los criterios de celularidad previamente definidos. Entre las unidades disponibles, se dio prioridad a la celularidad nucleada total y al número de células CD34+ antes de la congelación, atendiendo a la compatibilidad más alta. Cuando fue posible, se optó siempre por unidades con compatibilidad ABO y al año de almacenamiento de la unidad (preferible cuanto menos tiempo de almacenamiento hubiese transcurrido). Todas las unidades fueron negativas para virus de la inmunodeficiencia humana, hepatitis B y C, así como virus T-linfotrópicos humanos. Todas las unidades de cordón y las madres al momento del parto debían ser negativas para la determinación de IgM de citomegalovirus (CMV).

Las unidades criopreservadas de SCU fueron transportadas al Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana en un contenedor con nitrógeno líquido y en fase de vapor. Una vez recibidas, fueron conservadas en nitrógeno líquido hasta el momento de su uso. En ese momento el contenedor de la SCU se dejó en fase de vapor durante 5 – 10 minutos antes de proceder a la descongelación. Inmediatamente después, los contenedores se abrían con precaución para no dañar la bolsa que contiene la SCU. El proceso de descongelación se hizo según el método desarrollado por Rubinstein(92) con pequeñas modificaciones(93). La unidad de SCU se sumergía en un baño de agua a 37 °C. Tras esto, el contenido se trasladaba inmediatamente a una bolsa de transferencia y se mezclaba con un volumen igual de solución de descongelación que contenía un 10% de dextrano 40 y un 5% de albúmina humana. Tras equilibrar con la solución de descongelación durante 5 minutos, la bolsa de transferencia fue centrifugada a 400 g durante 10 minutos a 10 °C. Una vez el sobrenadante fue retirado, el concentrado de células fue resuspendido en 50 ml de solución de descongelación. Directamente de la bolsa antes de su infusión, se tomaron muestras para recuento de células, incluido CD34+, poblaciones linfocitarias, viabilidad, ensayos clonogénicos y estudios de control microbiológico.

4.1.3. Tratamiento de acondicionamiento

Con ligeras variaciones tal y como se ve en la Tabla 5 el esquema de acondicionamiento a lo largo de nuestro programa de TSCU se ha basado en el uso

de tiotepa, busulfán (BU), globulina anti-timocítica y ciclofosfamida (CY) o fludarabina (FLU). Inicialmente el esquema de acondicionamiento consistía en tiotepa 5 mg/kg/día durante los días -9 y -8; busulfán oral 1 mg/kg/6 horas durante los días -7 a -4, ciclofosfamida 60 mg/kg/día durante los días -4 y -3 y globulina anti-timocítica (ATG) de caballo a dosis de 60 mg/kg/día durante los días -5 a -2. Con posterioridad al año 2002 la ATG de caballo fue sustituida por la de conejo y el busulfán pasó a intravenoso. El régimen de acondicionamiento quedó de la siguiente manera: tiotepa 5 mg/kg/día durante los días -9 y -8; busulfán oral 3,2 mg/kg/día en dosis única durante los días -7 a -4, ciclofosfamida 60 mg/kg/día durante los días -4 y -3 y ATG de conejo a dosis de 2 mg/kg/día durante los días -5 a -2. El último cambio introducido fue la sustitución de la ciclofosfamida por fludarabina a partir del año 2005, de forma que los pacientes recibían tiotepa 5 mg/kg/día durante los días -9 y -8; busulfán IV 3,2 mg/kg/día en dosis única durante los días -7 a -4, fludarabina 50 mg/kg/día durante los días -5 a -3 y ATG de conejo a dosis de 2 mg/kg/día durante los días -5 a -2.

Tabla 5. Esquemas de acondicionamiento

Esquemas	TT	BF	CF	FLU	ATG-C	ATG-c
Esquema 1	5 mg/kg/día Días -9 y -8	1 mg/kg/6 horas Días -7 a -3	60 mg/kg/día Días -4 y -3	-----	60 mg/kg/día Días -5 y -2	-----
Esquema 2	5 mg/kg/día Días -9 y -8	3,2 mg/kg/día Días -7 a -3	60 mg/kg/día Días -4 y -3	-----	-----	2 mg/kg/día Días -5 y -2
Esquema 3	5 mg/kg/día Días -9 y -8	3,2 mg/kg/día Días -7 a -3	-----	50 mg/kg/día Días -5 a -3	-----	2 mg/kg/día Días -5 y -2

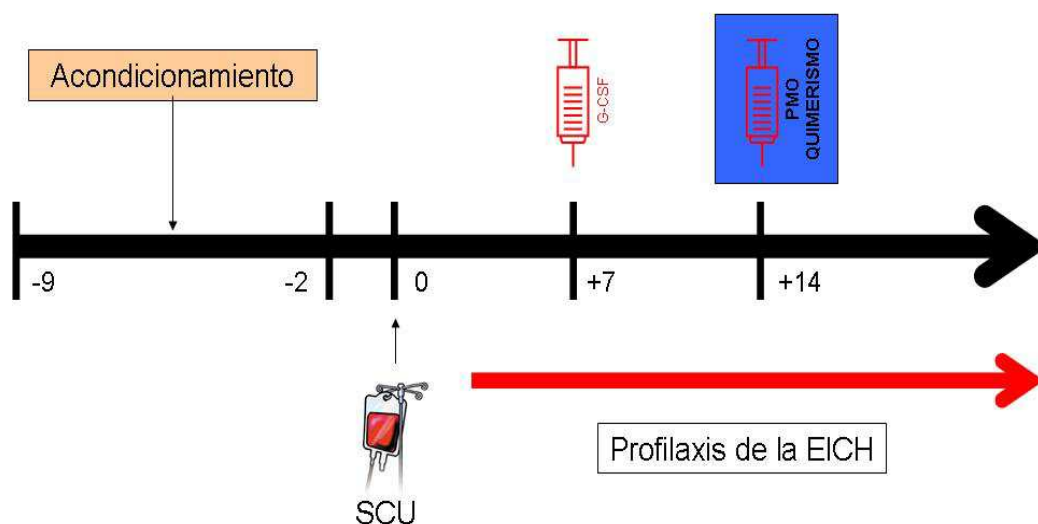
4.1.4. Profilaxis y tratamiento de la EICH

Todos los pacientes recibieron profilaxis de la EICH con ciclosporina 1,5 mg/kg/12h IV, seguido de 3 a 5 mg/kg/12h vía oral cuando la ingesta fue posible. La ciclosporina se fue reduciendo gradualmente entre los días +90 y +180 hasta su retirada en esta fecha, siempre que fuese posible. La ciclosporina se combinó inicialmente, hasta el año 2007, con prednisona a la dosis de 0,5 mg/kg/día en los días +7 a +14, 1 mg/kg/día en los días +14 a +28 y a partir de aquí se fue reduciendo lentamente hasta retirarlo en el día +180 si era posible. Entre los años 2007 y 2009, la ciclosporina se combinó con micofenolato-mofetilo (MMF) 15 mg/kg/12h hasta el día +28. A partir de 2009, se combinó ciclosporina con prednisona a la dosis de 1 mg/kg/día desde el día +14 al +28.

Los pacientes que desarrollaron EICH recibieron metilprednisolona a la dosis inicial de 20 mg/kg/día, reduciendo a la mitad cada tres días hasta alcanzar 1 mg/kg/día, dosis a partir de la cual se comenzaba una lenta reducción hasta su retirada. Los pacientes refractarios a esta primera línea recibieron globulina anti-timocítica como segunda línea de tratamiento. Los pacientes con EICH crónica fueron tratados con prednisona a 1 mg/kg/día.

4.1.5. Tratamiento de soporte

Todos los pacientes fueron ingresados y trasplantados en habitaciones con filtros de alta eficiencia para partículas de aire. Los pacientes disponían de acceso venoso central mediante catéter tunelizado de doble luz. Todos recibieron ciprofloxacino 500 mg/12 horas para descontaminación intestinal. La profilaxis antifúngica se realizó con fluconazol oral 100 mg al día hasta el año 2003 a partir del cual se utilizó itraconazol IV a la dosis de 200 mg/día.



Esquema básico del estudio y tratamiento en el que se observa acondicionamiento de los días -9 a -2, infusión de la unidad de sangre de cordón umbilical el día 0 y obtención de muestra de médula ósea para estudio de quimerismo el día +14.

Figura 1. Esquema básico del estudio.

La profilaxis frente al *pneumocystis jiroveci* se realizó con trimetoprim sulfametoxazol 320/1600 mg desde el día -10 al -2, reiniciándolo una vez consolidado el injerto. Se administraba entonces dos días por semana durante un año como mínimo o hasta la retirada de la inmunosupresión. Como se observa en la Figura 1, donde se muestra el esquema general del estudio, todos los pacientes recibieron G-CSF a la dosis de 5 ug/kg/día desde el día +7 hasta la recuperación de la neutropenia. Se administró además inmunoglobulinas IgG no específicas IV a la dosis de 500 mg/kg semanal durante los primeros 100 días y mensual durante un año después del trasplante.

La profilaxis y tratamiento de la infección por CMV se realizó inicialmente con ganciclovir IV y posteriormente con valganciclovir oral, tal y como se describe con detalle en un trabajo previo de nuestro grupo(94), en el que no se observaron

diferencias significativas entre ambos fármacos, salvo una mayor independencia del hospital para los que recibieron valganciclovir.

4.2 ESTUDIOS DE QUIMERISMO

4.2.1. Tipo de muestra para los estudios de quimerismo

El estudio de quimerismo de cada paciente se realizó en una muestra de médula ósea obtenida por punción y aspiración en el manubrio esternal en el día +14 del trasplante, cuando la inmensa mayoría de pacientes estaban en situación de aplasia profunda post-trasplante. Bajo anestesia local se obtenía una cantidad mínima de 2 ml de médula ósea sobre la que se procedería a la extracción del ADN. Todos los resultados de los análisis de quimerismo para este estudio fueron expresados en relación a la población hematopoyética nucleada total. No se realizaron análisis en subpoblaciones celulares, por lo que no se utilizó la separación con monoclonales magnéticos para no comprometer el estudio debido a la escasa cantidad de ADN que se obtiene con esta metodología en situación de aplasia(95, 96).

4.2.2. Selección de la técnica para el estudio del quimerismo

Como se ha descrito en el apartado 'antecedentes y estado actual del tema', originariamente se pensó que la presencia de una quimera completa del donante era un requisito imprescindible para un injerto adecuado(97). Sin embargo, la experiencia adquirida en el trasplante alogénico de pacientes con enfermedades no neoplásicas, como talasemias, inmunodeficiencias o anemias aplásicas graves, en los que se han utilizado esquemas de acondicionamiento menos agresivos, ha puesto en evidencia la coexistencia de la hematopoyesis de donante y receptor(86, 97-99). Estos quimerismos mixtos pueden verse incrementados o disminuidos a lo largo del trasplante, pudiendo acabar indicando un rechazo inminente del injerto o incluso la recidiva de la enfermedad, lo que ha conferido un cierto carácter dinámico a los estudios de quimerismo(82, 100-104). Sin embargo, el estudio del quimerismo en puntos concretos de momentos críticos del trasplante, como en la fase de aplasia inicial, puede proporcionar puntos de medición que definan un mayor riesgo de fallo de injerto(12).

Ya que en el presente trabajo se pretende establecer la relación entre una determinación puntual del quimerismo hematopoyético en la fase del postrasplante inmediato y la cinética del injerto o tasa de fallos de injerto, se pusieron como requisitos los siguientes aspectos para seleccionar la técnica con la que realizar los estudios de quimerismo:

1. Método robusto
2. Rápido
3. Que permita una cuantificación adecuada de material del donante y receptor
4. Una sensibilidad entre moderada y alta
5. Presencia de marcadores diferenciadores entre donante y receptor en el mayor número de casos posible.

Por estas razones, seleccionamos como técnica de estudio el análisis y caracterización de secuencias cortas de repetición en tándem o 'short tandem repeat (STR) markers'. En nuestro caso, usamos marcaje de los cebadores con fluorocromos y resolución de los productos de PCR mediante electroforesis capilar, lo que mejora sensiblemente la detección del quimerismo mixto y fundamentalmente su cuantificación(76, 78-81).

Con respecto a otras técnicas como citogenética(61, 62), fenotipo de glóbulos rojos(63, 64), FISH X/Y(67-72), longitud de polimorfismos de fragmentos de restricción(65, 66, 105, 106) o PCR en tiempo real(83-85, 107) la determinación de STR ofrece ciertas ventajas tal y como se muestra en la Tabla 6. Las nuevas técnicas de detección de polimorfismos de un único nucleótido (SNP) por PCR en tiempo real tienen una mayor sensibilidad que la detección de STR, pero más problemas de cuantificación, con coeficientes de variación entre 30% – 50% frente al 5%, fundamentalmente cuando el número de células autólogas es más alto. Por todo ello, la técnica más apropiada parece el estudio de STR marcados con fluorocromos y con resolución de la PCR por electroforesis capilar.

Tabla 6. Técnicas para el análisis del quimerismo

Técnicas	Sensibilidad (%)	Eficacia en la cuantificación	Desventajas
Antígenos Eritrocitarios	0,1 – 0,5	Moderada	Limitado a población eritroide
Citogenética	10 – 20	Baja	Baja sensibilidad y requiere metafases
Antígenos HLA	Variable	Variable	Limitado a TPH con disparidad HLA. No hay disponibilidad de todos los antígenos
FISH	0,1 – 2	Muy alta	Sólo disponible en disparidad de sexo
RFLP	5 – 20	Moderada	Dificultad técnica, moderada sensibilidad y eficacia de cuantificación. Requiere altos niveles de ADN
VNTR/STR con fósforoimagen	1 – 5	Moderada	Moderada sensibilidad y eficacia de cuantificación. Radioterapia
PCR-STR fluorescencia	1 – 5	Alta	Sensibilidad moderada
PCR en tiempo real	0,001 – 1	Moderada	Moderada eficacia en la cuantificación

FISH: Fluorescencia con hbridación in situ; VNTR: Variable Lumber of tandem repeats; STR: Short tandem repeats.

4.2.3. Protocolo de estudio del quimerismo hematopoyético

4.2.3.1 Características del método

El método utilizado para la cuantificación del quimerismo hematopoyético se basa en un kit de PCR multiplex para detección de STR, diseñado originariamente para propósitos forenses. El kit dispone de 11 STR distintos que incluyen amelogenina

y que son coamplificados en una misma reacción. La separación de los productos de PCR y la detección de la fluorescencia se realizó mediante electroforesis capilar, procediendo a la cuantificación de la proporción donante receptor. El cálculo del quimerismo del donante se basó en la ratio de las señales informativas de donante y receptor, como veremos más adelante. En la Tabla 7 se especifican los marcadores utilizados en la PCR multiplex.

Tabla 7. Marcadores STR empleados para el estudio del quimerismo.

Designación del locus	Localización cromosoma	Common sequence motif	Rango Tamaño (pb)	Marcador
D3S1358	3p	TCTA(TCTG) ₁₋₃ (TCTA) _n	114-142	5-FAM
vWA	12p12-ter	TCTA(TCTG) ₃₋₄ (TCTA) _n	157-209	5-FAM
D16S539	16q24-qter	(AGAT) _n	234-274	5-FAM
D2S1338	2q35-37.1	(TGCC) _n (TTCC) _n	289-341	5-FAM
Amelogenin	X:p22.1-22.3	-	107	JOE
	Y:p11.2		113	
D8S1179	8	(TCTR) _n *	128-172	JOE
D21S11	21q11.2-q21	(TCTA) _n (TCTG) _n [(TCTA) ₃ TA(TCTA) ₃ TCA(TCTA) ₂ TCCA TAJ(TCTA) _n	187-243	JOE
D18S51	18q21.3	(AGAA) _n	26-345	JOE
D19S433	19q12-13.1	(AAGG)(AAAG)(AAGG)(TAGG)	106-140	NED
		(AAGG) _n		
TH01	11p15.5	(AATG) _n	165-204	NED
FGA	4q28	(TTTC) ₃ TTTT TTCT (CTTT) _n CTCC	215-353	NED
		(TTCC) ₂		

4.2.3.2 Preparación del ADN

Para establecer el perfil específico de marcadores STR de cada pareja donante - receptor previo al trasplante, se obtuvo el ADN necesario a partir de muestras de sangre periférica del receptor y sangre del cordón que se iba a utilizar para el trasplante, mediante un procedimiento estándar de "salting out"(108). En estas situaciones en las que la cantidad de ADN que se obtiene es alta, este método proporciona buenos resultados. Se trata de un método rápido, barato y seguro para simplificar el procedimiento de desproteización. Este método implica la desalinización, precipitación y deshidratación de las proteínas celulares al someterlas a una solución saturada de cloruro sódico.

El quimerismo hematopoyético fue analizado en muestras de médula ósea no manipulada obtenidas en el día 14 postrasplante. El ADN de estas muestras fue extraído mediante el uso del kit Qiagen DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden Germany). La cuantificación del ADN por espectrofotometría es un paso importante, ya que el margen de ADN es estrecho (0,5 – 5 ng por reacción de PCR). La solución de ADN se incubó a 60° durante 30 minutos para conseguir que sea lo más homogénea posible antes de su cuantificación. Tras la cuantificación, el ADN fue diluido a una concentración final de 0,125 ng/μL en 10 μL de tampón TE.

4.2.3.3 PCR y electroforesis

Los marcadores STR fueron amplificados usando el kit AmpFSTR SGM plus (Applied Biosystems). La reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 25 μL. Se preparan 10,5 μL de tampón para PCR, 0,5 μL de AmpliTaq Gold DNA polimerasa y 5,5 μL de primer mix por muestra. Se añaden 15 μL de este master mix a 10 μL del ADN. La PCR fue llevada a cabo en un termociclador personal Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) tras optimizar los protocolos de trabajo.

La electroforesis capilar fue llevada a cabo mediante el secuenciador ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para el análisis de fragmentos, se utilizaron el polímero POP – 4, el capilar verde de 47 cm y 10 x 310 tampón GA con EDTA. Una porción de 1,5 ml de la reacción de PCR se mezcla con 25 ml de una solución que contiene 24,5 ml de formamida demonizada y 0,5 ml de Genescan ROX 500 de talla estándar. Las muestras fueron desnaturizadas a 95 °C durante 3 minutos y posteriormente enfriadas en un baño de agua fría. Después de

colocar las muestras en el carro se programaron diferentes tiempos de inyección (5 s, 10 s, 15 s y 20 s). La carga de cantidades incrementales de producto de PCR permite la identificación de las tallas de los picos óptimos para proceder a la cuantificación.

4.2.3.4 Cuantificación del quimerismo

Los datos recolectados tras la electroforesis fueron analizados con el software Genescan y el genotipado automático de los alelos se realizó con el software Genotyper (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). En la actualidad, ambos programas están fusionados en el software GeneMapper que permite el análisis de fragmentos. Para cada muestra se imprimen en pantalla las correspondientes curvas de fluorescencia. Los picos de donante y receptor se alinean en el modo “size” para tener una rápida visión de aquellos que resultan informativos, por ejemplo, diferentes alelos entre donante y receptor. Los picos que sean informativos (diferentes entre donante y receptor) se identifican en las muestras postrasplante de acuerdo a su tamaño. La cuantificación se puede realizar según el área bajo el pico o la altura del pico, aunque en nuestro laboratorio utilizamos la primera por ser más fiable. Junto con los marcadores STR iguales entre donante y receptor, existen opciones diferentes que requieren aproximaciones distintas para efectuar el cálculo del quimerismo. Este procedimiento es un tanto tedioso por lo que se diseñó una hoja de Excel que simplificase el problema. A continuación se exponen las fórmulas para la cuantificación. El resultado final de la cuantificación se hizo mediante el promedio de todos los marcadores STR informativos entre donante y receptor. Las distintas situaciones para las distintas combinaciones de marcadores STR son las siguientes:

1. Los picos del donante y receptor son homocigotos o heterocigotos y no comparten ningún alelo común. En la siguiente situación se suman las áreas de los picos de donante y receptor y se calcula el porcentaje de las áreas de los picos del donante.

$$\% \text{ de donante} = 100 \times \frac{(\text{Área C} + \text{Área D})}{(\text{Área A} + \text{Área B}) + (\text{Área C} + \text{Área D})}$$

2. El receptor y el donante son heterocigotos y comparten un alelo. En este caso se desestima el alelo común, por ejemplo el B y se suman las áreas de los picos A y C calculando el porcentaje del alelo del donante que no es compartido.

$$\% \text{ de donante} = 100 \times \frac{\text{Área C}}{\text{Área A} + \text{Área C}}$$

3. El donante o el receptor son heterocigotos y uno de los alelos heterocigotos es similar al alelo homocigoto del otro individuo. Aunque el cálculo del porcentaje de donante es posible en esta situación según la fórmula establecida más abajo, el coeficiente de variación puede ser muy amplio y recomendamos no utilizar estos marcadores para la cuantificación total.

$$\% \text{ de donante} = 100 \times \frac{\text{Área B}}{(\text{Área A} - \text{Área B})/2 + \text{Área B}}$$

En la Figura 2 se muestran algunos de los ejemplos de quimerismo en función de los alelos que comparten el donante y receptor.

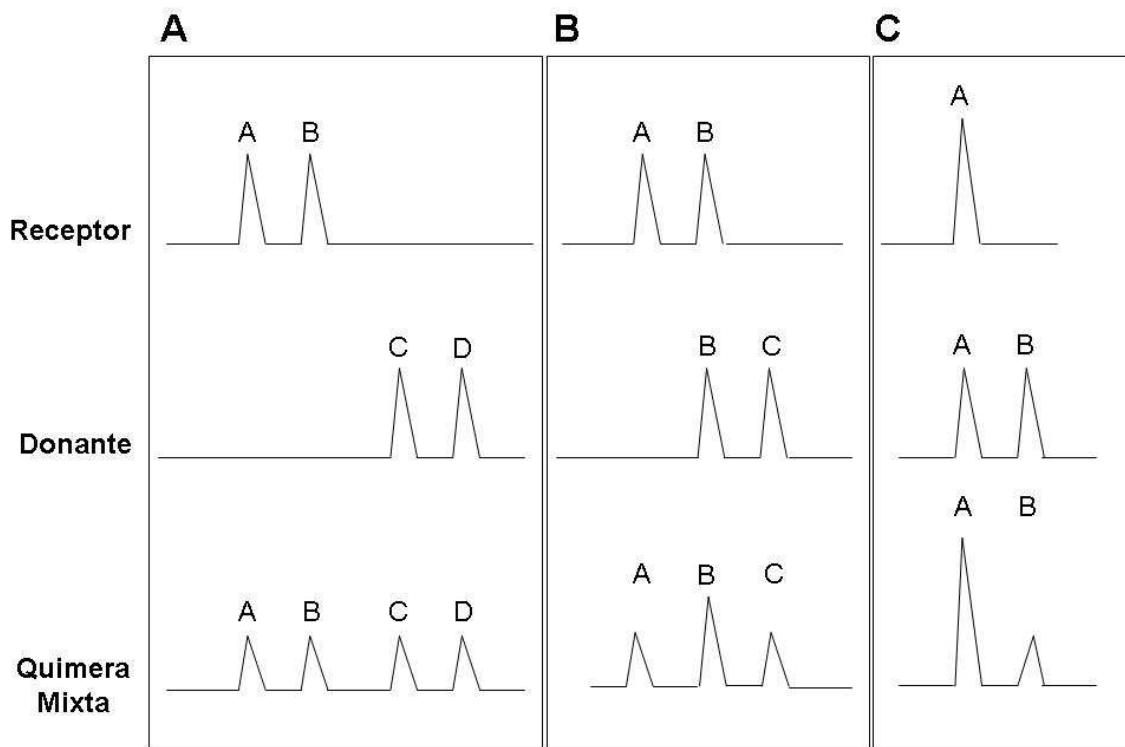


Figura 2. Ejemplos de quimerismo mixto

La sensibilidad de los estudios de quimerismo por esta metodología es de un mínimo del 5% y un máximo del 1%, con una sensibilidad promedio del 3%. Los niveles más altos de sensibilidad se obtienen ante la presencia de alelos homocigotos tanto en donante como en receptor.

4.3 DEFINICIONES

4.3.1. Quimerismo mixto

Tal y como se observa en la Figura 3, el quimerismo mixto se define como la presencia de menos de un 90% de material del donante en las muestras de médula ósea obtenidas en el día 14 tras el trasplante.

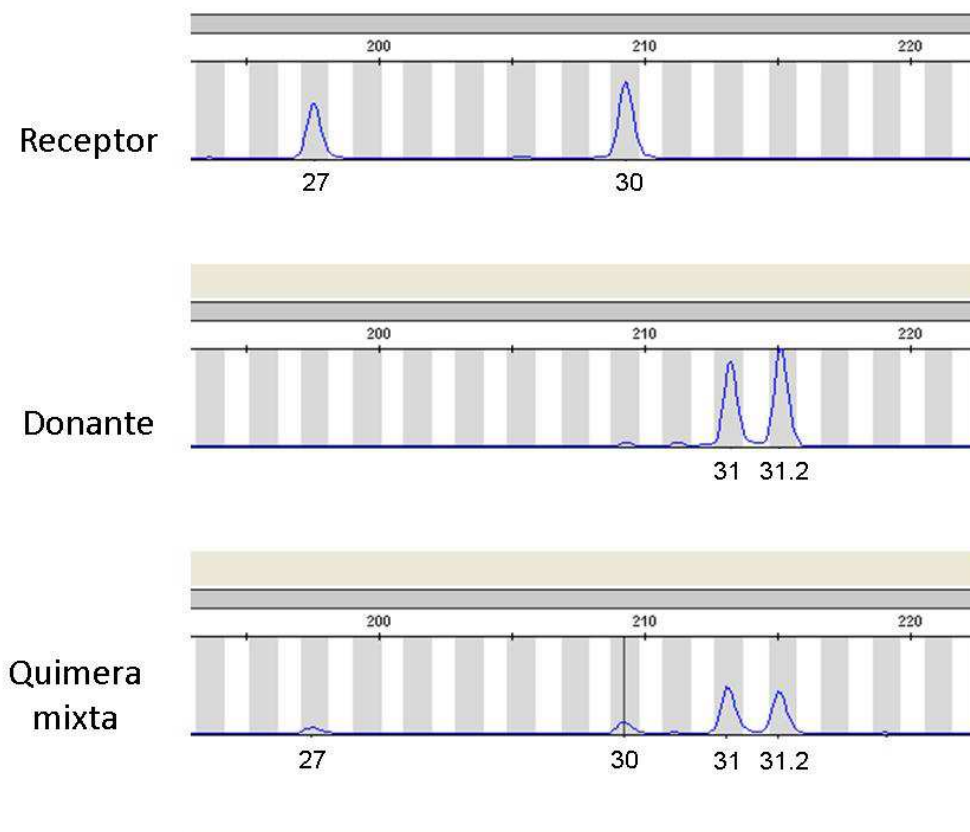


Figura 3. Quimerismo mixto tras TSCU

4.3.2. Quimerismo completo

Se denomina quimerismo completo cuando en el estudio postrasplante no se encuentra ADN del receptor o éste está en cantidad inferior al 10%, tal y como se muestra en la Figura 4.

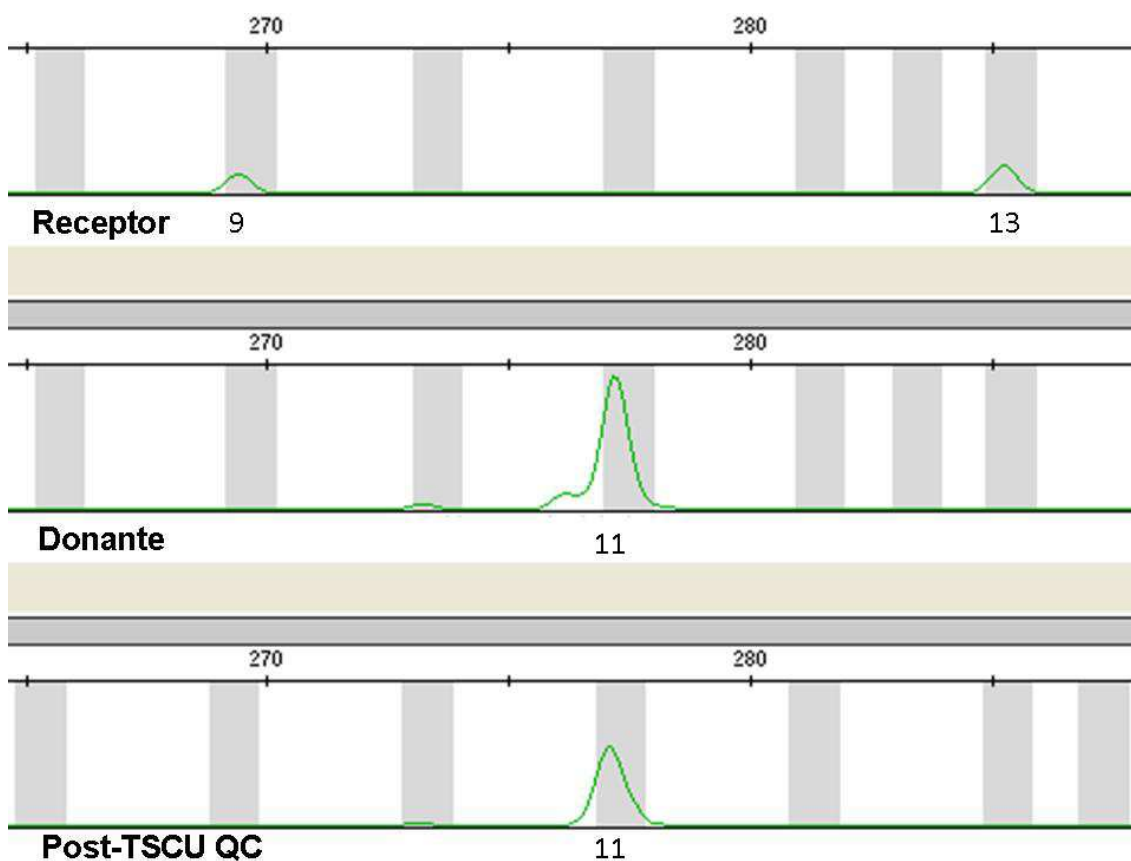


Figura 4. Quimera completa tras TSCU

4.3.3. Quimerismo en 'split'

El concepto de quimerismo en 'split' hace referencia a la presencia de distintas líneas con distinto origen en el donante o el receptor. Por ejemplo, es posible que se haya producido un injerto de la serie linfóide T con quimera completa del donante en esa serie, mientras que la serie mieloide presente un material del receptor del 100%. En estos casos, la inmunidad adicional T no ha sido suficiente para conseguir un

injerto completo de todas las series. Esta situación puede apreciarse con claridad en la Figura 5 y la Figura 6.

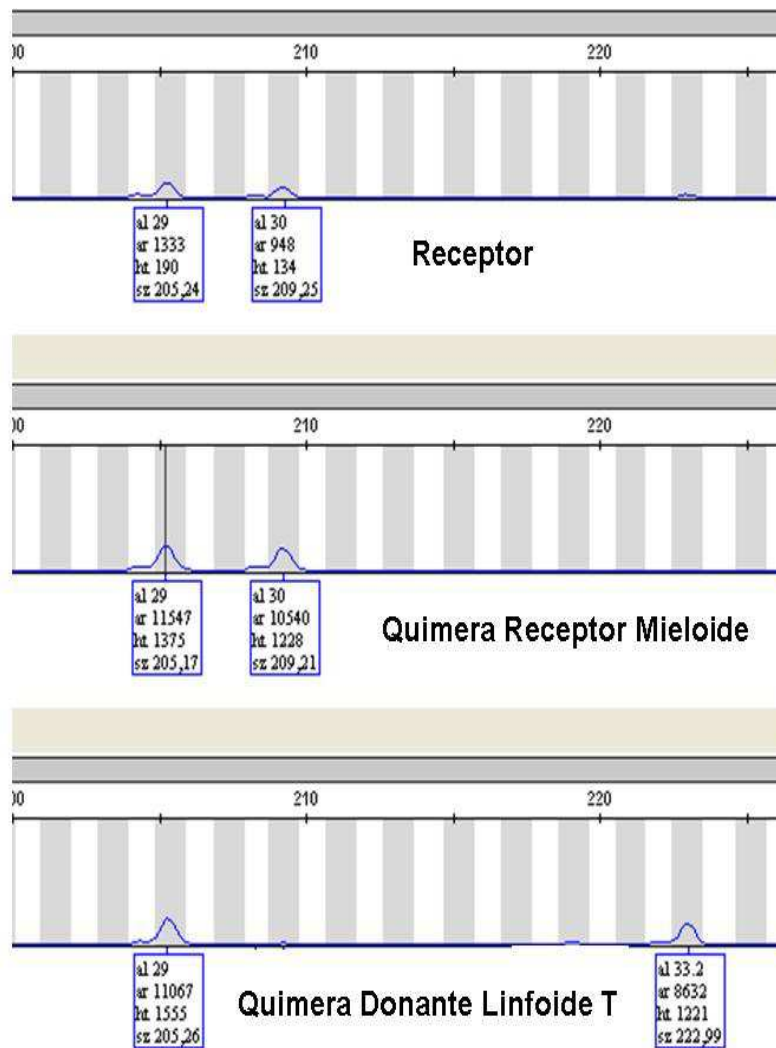


Figura 5. Quimerismo en 'split' con 100% de material del donante en la población mioeloide

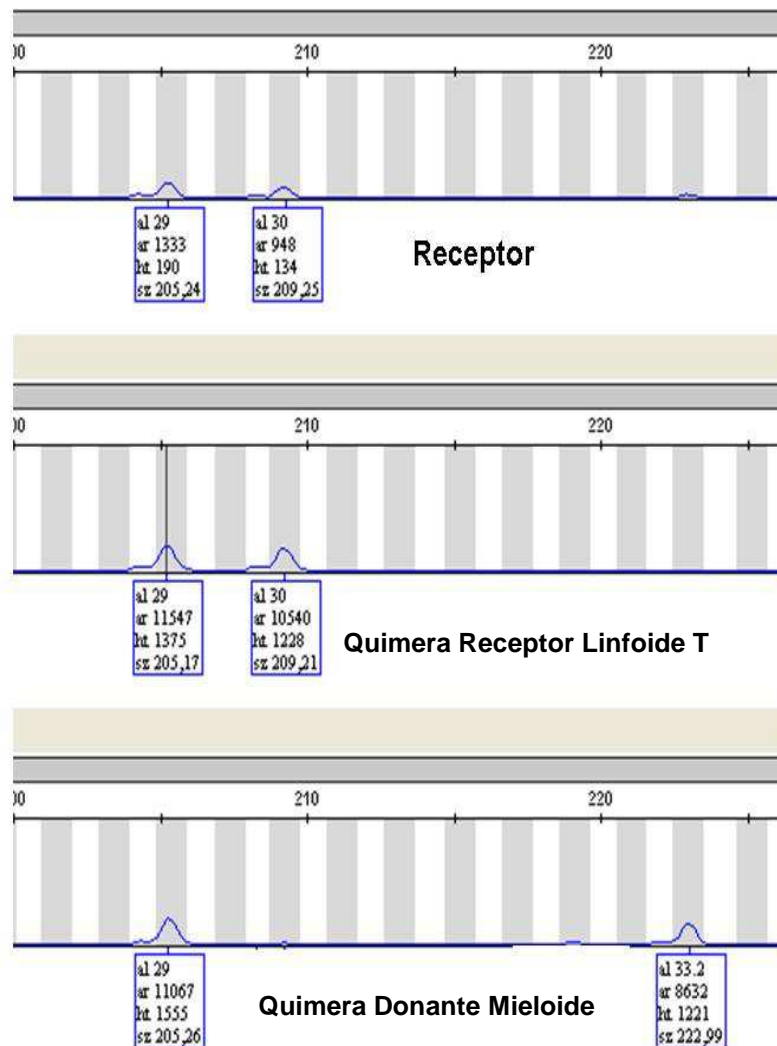


Figura 6. Quimerismo split con 100% de material del donante en la población linfocito T

4.3.4. Injerto mieloide

El injerto mieloide fue definido como el primer día con un recuento de polimorfonucleares de $0,5 \times 10^9/L$ o mayor durante 3 días consecutivos. Se consideró que los pacientes tenían un fallo de injerto si habían sobrevivido más de 28 días y no habían alcanzado injerto mieloide. Para estimar la incidencia acumulada de injerto

mieloide se consideraron eventos competitivos la muerte precoz o la realización de un segundo trasplante sin que se hubiese producido la recuperación hematopoyética del primero.

4.3.5. Injerto plaquetar

El injerto plaquetar fue definido como el primer día de un recuento plaquetar mayor de $20 \times 10^9/L$ sin soporte transfusional durante al menos una semana. Para estimar la incidencia acumulada de injerto plaquetar se consideraron eventos competitivos la mortalidad precoz o la realización de un segundo trasplante sin que se hubiese producido la recuperación plaquetar del primero.

4.3.6. Estadio de la enfermedad

El estadio de la enfermedad al momento del TSCU fue definido como:

- **Estadio precoz:** pacientes con leucemia aguda, linfoma o síndrome mielodisplásico (SMD) en primera remisión completa (RC1), leucemia mieloide crónica (LMC) en primera fase crónica y anemia refractaria no tratada.
- **Estadio intermedio:** pacientes con leucemia aguda, linfoma o SMD en segunda o ulterior remisión completa, LMC en segunda fase crónica o fase acelerada.
- **Estadio avanzado:** leucemia aguda y linfoma refractario o en recaída, LMC en crisis blástica y anemia refractaria con exceso de blastos (AREB) no tratada.

4.3.7. Enfermedad injerto contra huésped aguda

La EICH aguda se definió como el cuadro clínico con afectación cutánea, hepática o intestinal consecuencia de la reacción inmunológica del injerto frente al paciente que apareció en los 100 primeros días tras el trasplante. El grado de EICH aguda fue definido de acuerdo a criterios estándar. La EICH aguda fue clasificada en función de su grado de afectación cutánea (Tabla 8), hepática (

Tabla 9) e intestinal (Tabla 10). De la gradación de estos tres sistemas se obtuvo el grado final de la EICH (Tabla 11).

Tabla 8. Gradación de la EICH aguda cutánea.

Estadio	Criterio clínico
+	Exantema maculopapular menor al 25% de la superficie corporal total
++	Exantema maculopapular entre el 25% y 50% de la superficie corporal total
+++	Eritrodermia generalizada
++++	Descamación y bullas

Tabla 9. Gradación de la EICH aguda hepática.

Estadio	Criterio clínico
+	Bilirrubina entre 2 y 3 mg /dl
++	Bilirrubina entre 3 y 6 mg /dl
+++	Bilirrubina entre 6 y 15 mg /dl
++++	Bilirrubina mayor de 15 mg /dl

Tabla 10. Gradación de la EICH aguda intestinal.

Estadio	Criterio clínico
+	Diarrea entre 500-1000 ml/d o náuseas persistentes
++	Diarrea entre 1000-1500 ml/d
+++	Diarrea mayor de 1500 ml/d
++++	Dolor abdominal intenso con o sin íleo

Tabla 11. Gradación global de la EICH aguda.

Grado global	Cutáneo	Hepático	Gastrointestinal	Afectación del estado general
--------------	---------	----------	------------------	-------------------------------

Grado 0	0	0	0	0
Grado I	+ / ++	0	0	0
Grado II	+ / +++	+	+	+
Grado III	++ / +++	++ / +++	++ / +++	++
Grado IV	++ / ++++	++ / ++++	++ / ++++	+++

4.4 ESTUDIOS ESTADÍSTICOS

4.4.1. Variables incluidas en el análisis estadístico

En la Tabla 12 se enumeran las variables que fueron analizadas para su asociación con los distintos “end points” establecidos.

Tabla 12. Variables analizadas.

Variables Relacionadas con el paciente y su tratamiento	Variables relacionadas con el inóculo
Edad	Viabilidad
Sexo del Paciente	CNT a la criopreservación
Sexo de Donante y Receptor	CFU a la criopreservación
Peso	CD34+ a la criopreservación
Diagnóstico	CNT infundidas
Estadio al Trasplante	CFU infundidas
Compatibilidad HLA	CD34+ infundidas
Tratamiento de Acondicionamiento	CD3+ infundidas
Profilaxis de la EICH	CD4+ infundidas
Compatibilidad ABO	CD8+ infundidas
Estatus para CMV	CD19+ infundidas
Trasplante Autólogo Previo	CD56+ infundidas
Quimerismo en día +14	

4.4.2. Análisis estadístico

Para la estimación de la incidencia acumulada de injerto mieloide, injerto plaquetar, EICH aguda y mortalidad relacionada con el trasplante, se utilizó el método de la incidencia acumulada o riesgos competitivos (probabilidad marginal)(109, 110). En todos los casos el tiempo fue considerado desde el momento del trasplante o día cero.

Para el estudio de la prevalencia de fallo de injerto, las diferencias en la distribución de las variables categóricas entre los distintos subgrupos de pacientes se analizaron mediante el test de chi-cuadrado con la corrección de Yates, cuando ésta era necesaria. En el caso de variables continuas, las diferencias existentes entre grupos se calcularon mediante el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney o el test de la t de student, de acuerdo a la normalidad de la distribución. Todos los valores de p fueron calculados usando “tests de dos colas”.

Los estudios de correlación entre los distintos datos de celularidades se realizaron mediante el test de Rho de Spearman para estudios no paramétricos.

Las variables continuas fueron categorizadas para los estudios de incidencia acumulada utilizando la mediana como punto de corte, a excepción de los resultados del quimerismo que se categorizaron en incrementos de 10 puntos desde 50 hasta 90. El nivel de significación estadística se estableció en un valor de p de 0,05 o inferior, pero todas las variables con un valor de $p < 0,1$ fueron incluidas en un análisis multivariante, utilizando el modelo de regresión logística o el método de Fine and Gray para la incidencia acumulada(110).

El análisis estadístico se realizó usando el paquete estadístico R version 2.13.2(111), usando los paquetes maxstat v0.7-14, survival v2.36-10, Design 2.3-0, prodlim v1.2.1 y cmprsk v2.2-2, con excepción de los gráficos de correlación lineal que se realizaron en el sistema SPSS versión 15.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES E INJERTO

5.1.1. Características demográficas

En total se incluyeron 148 pacientes con neoplasias hematológicas que recibieron un TSCU entre los años 2000 y 2011 y que disponían de estudio de quimerismo en el día 14 post-trasplante. Las características de los pacientes se encuentran resumidas en la Tabla 13. La edad mediana fue de 32 años con extremos entre 15 y 55 años. La mayoría de pacientes fueron varones (68%) y recibieron el trasplante como parte del esquema de tratamiento de una leucemia aguda, en concreto un 76% de los casos, mientras que el 24% restante incluían SMD, LMC, LLC, LNH u otras enfermedades.

De acuerdo a los parámetros definidos previamente, el 43% de los enfermos se encontraban en un estadio precoz de su enfermedad, el 30% en un estadio avanzado y el 27% en un estadio intermedio. La mediana de peso de los pacientes fue de 74 kg con extremos entre 37 y 112 kg. El estado serológico para el CMV fue positivo en 114 pacientes (77%) y un 12% habían recibido un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos previamente.

Tabla 13. Características de los pacientes

Características	Mediana (extremos)	n (porcentaje)
Edad en años		
Mediana	32	
Extremos	15-55	
Sexo del paciente		
Hombre		101 (68)
Mujer		47 (32)
Diagnóstico		
Leucemia mieloblástica aguda		54 (36)
Leucemia linfoblástica aguda		59 (40)
Síndrome mielodisplásico		8 (5)
Leucemia mieloide crónica		10 (7)
Síndrome linfoproliferativo crónico		13 (9)
Otros		4 (3)
Estadio de la enfermedad		
Avanzado		44 (30)
Precoz		63 (43)
Intermedio		41 (27)
Peso (kg)		
Mediana	74	
Extremos	37-112	
Estado serológico anti-CMV		
Positivo		114 (77)
Negativo		34 (23)
Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos previo		
Sí		18 (12)
No		130 (88)

En la Tabla 14 se describe la distribución de los regímenes de acondicionamiento y profilaxis de la EICH administrados. El tratamiento de acondicionamiento incluyó busulfán, ciclofosfamida, tiotepa y ATG en 42 pacientes (28%) mientras que el resto recibió la misma combinación pero sustituyendo la ciclofosfamida por fludarabina. El busulfán se administró por vía IV en la mayoría de pacientes y tan sólo un 11% de los casos lo recibieron por vía oral. En sólo un 6% de los pacientes el ATG se administró en forma de linfoglobulina, mientras que en el 94% de los casos se utilizó timoglobulina. El 30% de los pacientes recibió una combinación de ciclosporina A y micofenolato mofetilo (MMF). El resto recibió ciclosporina A en combinación con prednisona VO. En el 53% la prednisona se administró en pauta larga y en el 17% en pauta corta.

Tabla 14. Tratamiento de acondicionamiento y profilaxis de la EICH

Esquema de Tratamiento	n (porcentaje)
Régimen de Acondicionamiento	
BUCY-TT-ATG	42 (28)
BUFLU-TT-ATG	106 (72)
Vía de administración de busulfán	
Intravenoso	134 (89)
Oral	16 (11)
Tipo de gammaglobulina anti-timocítica	
Linfoglobulina	9 (6)
Timoglobulina	139 (94)
Profilaxis de la Enfermedad de Injerto Contra Huésped	
CSA + MF	45 (30)
CSA + PDL*	78 (53)
CSA + PDC**	25 (17)

* Prednisona en pauta larga

** Prednisona en pauta corta

5.1.2. Características de las unidades de sangre de cordón umbilical

En lo que se refiere a las unidades de cordón, y tal y como se describe en la Tabla 15, la inmensa mayoría de los pacientes presentaron algún grado de disparidad HLA con las unidades trasplantadas. Únicamente 10 pacientes recibieron unidades HLA-idénticas (7%). El resto presentaba una (21%) o dos (72%) disparidades a nivel de los locus estudiados.

En más de la mitad de los casos existía disparidad de sexo entre donante y receptor y una incompatibilidad mayor al sistema ABO en el 29% de los casos.

El tiempo de almacenamiento de las unidades de cordón antes de proceder a su trasplante fue muy variable, con una mediana de 38 meses pero con extremos que llegaban hasta los 173 meses. Al momento de la descongelación, la mediana de la viabilidad de las células fue de un 69% (extremos entre 35% y 93%).

Tabla 15. Características básicas de las unidades de SCU

Características	Mediana (extremos)	n (porcentaje)
Disparidad de Sexo Donante-Receptor		
Hombre-Hombre		52 (35)
Hombre-Mujer		23 (16)
Mujer-Mujer		24 (16)
Mujer-Hombre		49 (33)
Incompatibilidad de grupo ABO		
No		67 (45)
Incompatibilidad Mayor		43 (29)
Incompatibilidad Menor		38 (26)
Compatibilidad HLA		
6/6		10 (7)
5/6		32 (22)
4/6		106 (72)
Tiempo de almacenamiento, meses		
Mediana	38	
Extremos	0-173	
Viabilidad (%)		
Mediana	69	
Extremos	35-93	

En lo que se refiere a los datos básicos de celularidad de las unidades de cordón se muestran en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Destaca una cifra de células CD34+ infundidas con una mediana de $1,4 \times 10^5$ por

kilogramo de peso del receptor, con extremos entre $0,3 \times 10^5$ por kilogramo y 10×10^5 por kilogramo.

Tabla 16. Celularidades básicas de las unidades de cordón

Celularidad	Precongelación Mediana (extremos)	Postcongelación Mediana (extremos)	P Wilcoxon
CNT			
Mediana	2,98	2,46	< 0,001
Extremos	1,49 – 7,53	1,03 – 5,88	
Células CD34+			
Mediana	1,64	1,36	0,018
Extremos	0,27 – 6,76	0,27 – 10,09	
CFU-GM			
Mediana	2,46	2,59	0,27
Extremos	0,05 – 6,76	0 – 142.41	

En términos generales, se observó una disminución estadísticamente significativa entre los valores de celularidad previos a la criopreservación, en base a los que se solicitó la unidad de cordón y los obtenidos tras el proceso de descongelación. Si bien el descenso se produjo en todas las subpoblaciones analizadas, fue especialmente marcado en la CNT que pasó de una mediana de 3×10^7 a $2,5 \times 10^7$ por kg de peso del receptor ($P = 0,018$) y células CD34+ que bajaron de una mediana de $1,7 \times 10^5$ a $1,4 \times 10^5$ por kg de peso del receptor ($P < 0,001$), tal y como se aprecia en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

En la Tabla 17 se especifican los valores de linfocitos y subpoblaciones linfocitarias infundidas tras la descongelación. La mayoría de los linfocitos contenidos en el injerto fueron linfocitos T (CD3 positivos). La mayoría de estos linfocitos T correspondieron a la subpoblación de linfocitos T CD4+.

Tabla 17. Poblaciones linfocitarias en el injerto

Subpoblaciones de linfocitos	Mediana (extremos)
Linfos post x 10⁷ por kg	
Mediana	1
Extremos	0,3 - 3,3
CD3 post x 10⁷ por kg	
Mediana	0,6
Extremos	0,2 - 1,7
CD4 post x 10⁷ por kg	
Mediana	0,42
Extremos	0,01 - 1,2
CD8 post x 10⁷ por kg	
Mediana	0,16
Extremos	0,05 - 1
CD56 post x 10⁷ por kg	
Mediana	0,23
Extremos	0,04 - 0,9
CD19 post x 10⁷ por kg	
Mediana	0,20
Extremos	0,02 - 1,1

5.2 RESULTADOS DEL ESTUDIO DE QUIMERISMO

5.2.1. Análisis descriptivo del quimerismo en el día 14 postrasplante

La mayoría de pacientes (64%) alcanzaron una quimera completa del donante antes de iniciar la recuperación hematopoyética en sangre periférica. Más de dos

tercios de estos pacientes con quimera completa presentaron valores por encima del 95% de material del donante.

El resto de pacientes (36%) presentaron una quimera mixta en el día 14 tras el TSCU con una variación importante en el valor de ese quimerismo (Figura 7). Aunque el 50% de los pacientes con quimera mixta mantenían valores superiores al 80%, el resto tuvieron valores realmente bajos, con una persistencia importante de material del receptor o incluso predominio de éste último.

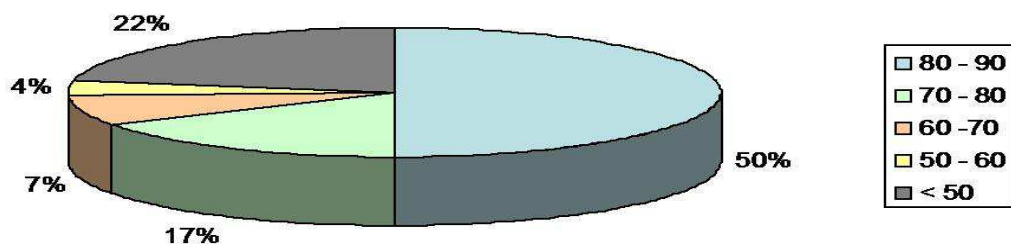


Figura 7. Distribución de los resultados del quimerismo mixto

5.2.2. Factores que influyen en el quimerismo

En la Tabla 18 se muestra la influencia que distintas variables relacionadas con el paciente y el trasplante tienen sobre el quimerismo 14 días tras el TSCU. El uso de micofenolato mofetilo para la profilaxis de la EICH fue el único factor que se asoció significativamente con una mayor incidencia de quimera mixta. Los pacientes que recibieron profilaxis de la EICH con ciclosporina A y micofenolato presentaron una quimera mixta en el 53% de los casos frente al 29% de los pacientes que recibieron ciclosporina A y prednisona ($P = 0,009$).

Tabla 18. Características basales del paciente y resultado del quimerismo en el día 14 post-TSCU

Características	Quimera completa n (porcentaje)	Quimera mixta n (porcentaje)	Valor de P
Sexo			
Hombre	62 (66)	39 (72)	0,6
Mujer	32 (34)	15 (28)	
Estatus serológico CMV			
Positivo	72 (77)	42 (78)	1
Negativo	22 (23)	12 (22)	
Diagnóstico			
Leucemia aguda	74 (79)	39 (72)	0,5
Otros	20 (21)	15 (28)	
Estadio			
Avanzado	24 (26)	20 (37)	0,2
Intermedio	25 (27)	16 (30)	
Precoz	45 (47)	18 (33)	
Edad en años			
≤ 30	39 (42)	23 (43)	1
> 30	55 (58)	31 (57)	
Auto-TPH previo			
No	81 (86)	49 (91)	0,6
Sí	13 (14)	5 (9)	
Peso en kg			
≤ 70	44 (47)	25 (46)	0,9
> 70	50 (53)	29 (54)	

Tabla 18 bis. Características del trasplante y resultado del quimerismo en el día 14 post-TSCU

Características	Quimera completa n (porcentaje)	Quimera mixta n (porcentaje)	Valor de P
Compatibilidad HLA			
4 sobre 6	64 (68)	42 (78)	0,3
5 – 6 sobre 6	30 (32)	12 (22)	
Acondicionamiento			
BUCY	30 (32)	11 (20)	0,2
BUFLU	64 (68)	43 (80)	
Busulfán			
Oral	13 (14)	3 (6)	0,2
Intravenoso	81 (86)	51 (94)	
ATG			
Linfoglobulina	8 (9)	1 (2)	0,2
Timoglobulina	86 (91)	53 (98)	
Incompatibilidad ABO			
No	45 (48)	22 (40)	0,6
Menor	27 (29)	16 (30)	
Mayor	22 (23)	16 (30)	
Sexo Donante – Receptor			
Hombre – Hombre	28 (30)	24 (44)	0,2
Hombre – Mujer	18 (19)	5 (9)	
Mujer – Hombre	34 (36)	15 (28)	
Mujer – Mujer	14 (15)	10 (19)	
Profilaxis EICH			
CsA – Prednisona	73 (78)	30 (56)	0,009
CsA – Micofenolato	21 (22)	24 (44)	

En la Tabla 19 se detalla la relación entre la celularidad de las unidades de cordón trasplantadas y la incidencia de quimerismo mixto 14 días después del trasplante. Se observó una mayor incidencia de quimera mixta en los pacientes que recibieron una menor dosis de células CD34+ ajustada por kg de peso ($P = 0,008$). En el análisis multivariante incluyendo tanto las variables relacionadas con el paciente y su tratamiento, como los datos referentes a celularidad, sólo la cifra de células CD34+ demostró tener un valor pronóstico independiente sobre el quimerismo. Conforme las dosis de células CD34+ infundidas son menores la incidencia de quimerismo mixto aumenta.

Tabla 19. Relación entre celularidad de las unidades de cordón y quimerismo en día 14 post-trasplante

Celularidad	Quimera completa Mediana (extremos)	Quimera mixta Mediana (extremos)	Valor de P
CNT pre x 10⁷ por kg			
	2,8	3,3	0,5
	1,8 – 6,9	2 – 7,1	
CD34 pre x 10⁵ por kg			
	1,7	1,8	0,4
	0,7 – 6,4	0,3 – 6,8	
CFU pre x 10⁴ por kg			
	2,6	2,1	0,8
	0,1 – 22,4	0,1 – 14,8	
CNT post x 10⁷ por kg			
	2,4	2,7	0,6
	1,2 – 5,7	1,5 – 5,9	
CD34 post x 10⁵ por kg			
	1,4	1,3	0,008
	0,6 – 5,7	0,3 – 5,1	
CFU post x 10⁴ por kg			
	2,6	2,4	0,2
	0,1 – 92,1	0,3 – 96,1	
Linfocitos post x 10⁷ por kg			
	1	1	0,3
	0,3 – 2,6	0,5 – 3,3	

Tabla 19 bis. Relación entre celularidad de las unidades de cordón y quimerismo en día 14 post-trasplante

Celularidad	Quimera completa n (extremos)	Quimera mixta n (extremos)	Valor de P
CD3 post x 10⁷ por kg	0,6	0,6	0,5
	0,2 – 1,6	0,3 – 1,7	
CD4 post x 10⁷ por kg	0,4	0,4	0,7
	0,1 – 1,1	0 – 1,2	
CD8 post x 10⁷ por kg	0,2	0,2	0,2
	0,1 – 1	0,1 – 0,5	
CD56 post x 10⁷ por kg	0,3	0,2	0,06
	0 – 0,8	0,1 – 0,9	
CD19 post x 10⁷ por kg	0,2	0,2	0,2
	0,1 – 0,6	0,1 – 0,8	

5.3 CINÉTICA DEL INJERTO MIELOIDE

5.3.1. Descripción del injerto mieloide

Tres pacientes fallecieron en los días 16, 19 y 24 tras el TSCU sin constatar injerto mieloide. Siete pacientes presentaron un fallo primario de injerto y otros dos pacientes adicionales un fallo secundario. Un total de 136 pacientes injertaron con una mediana de 20 días (extremos, 11 – 57). La incidencia acumulada de injerto fue del 96% a los 60 días (Figura 8).

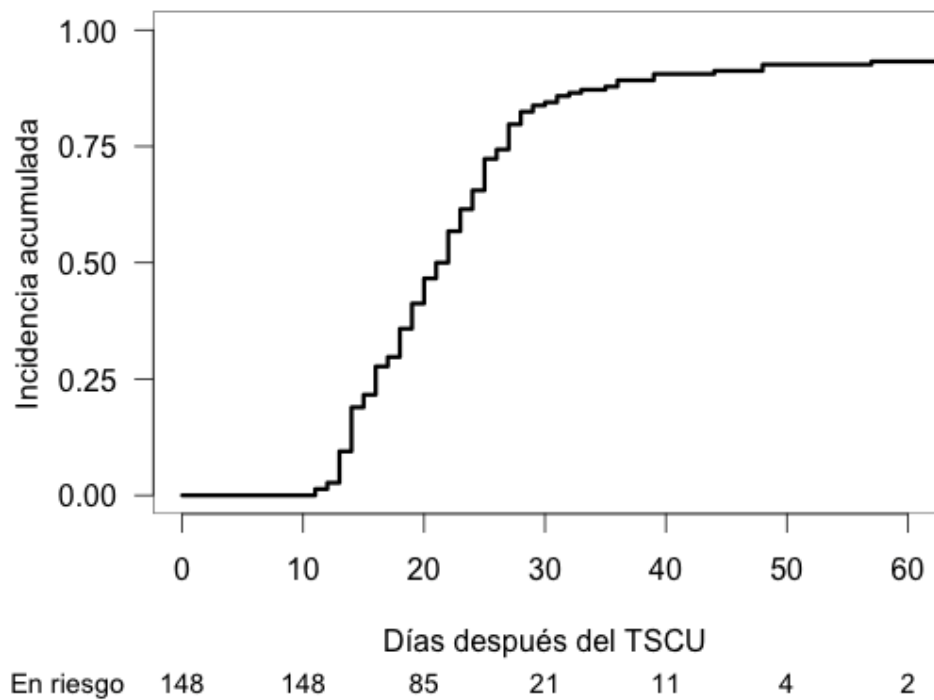


Figura 8. Incidencia acumulada de injerto mieloide

5.3.2. Análisis univariante de factores para injerto mieloide

Múltiples variables, tanto relacionadas con las características de los pacientes y su tratamiento, como con la celularidad contenida en las unidades de cordón umbilical, se asociaron con la probabilidad de injerto mieloide. En la Tabla 20 se muestran las variables de los pacientes y del acondicionamiento al trasplante que tuvieron relación significativa con la incidencia acumulada de injerto mieloide.

Tabla 20. Características del paciente asociadas significativamente con el injerto mieloide

Variable	Categoría Desfavorable	Mediana (días)	Incidencia acumulada a 60 días (%)	Valor de P Test de Gray
Quimera	< 90%	18 – 24	99 vs. 83	< 0,0001
	< 80%	20 – 25	98 vs. 74	0,0001
	< 70%	20 – 23	98 vs. 61	0,0003
	< 60%	20 – 25	98 vs. 50	0,0007
	< 50%	21 – 25	97 vs. 50	0,0007
Sexo	Varón	20 – 21	98 vs. 91	0,06
Peso	> 70	19 – 22	97 vs. 90	0,02
Diagnóstico	No LA	20 – 24	96 vs. 86	0,008
Estado serológico CMV	Positivo	18 – 21	97 vs. 92	0,03
Profilaxis EICH	Micofenolato	19 – 23	94 vs. 91	0,06

Los resultados del quimerismo en el día 14 post-trasplante tuvieron una marcada influencia sobre la incidencia acumulada de injerto al día 60 analizados en diferentes puntos de corte. Tanto la probabilidad de injerto, como la mediana de tiempo hasta el mismo, fue mayor en los pacientes que presentaron una quimera precoz completa que en aquellos en los que la quimera fue mixta, tal y como se

muestra en la Figura 9. La probabilidad de injerto fue del 99% frente al 83% ($P < 0,0001$) para los pacientes con quimera completa frente a aquellos que presentaron una quimera mixta, con una mediana de días hasta el injerto de 18 vs. 24.

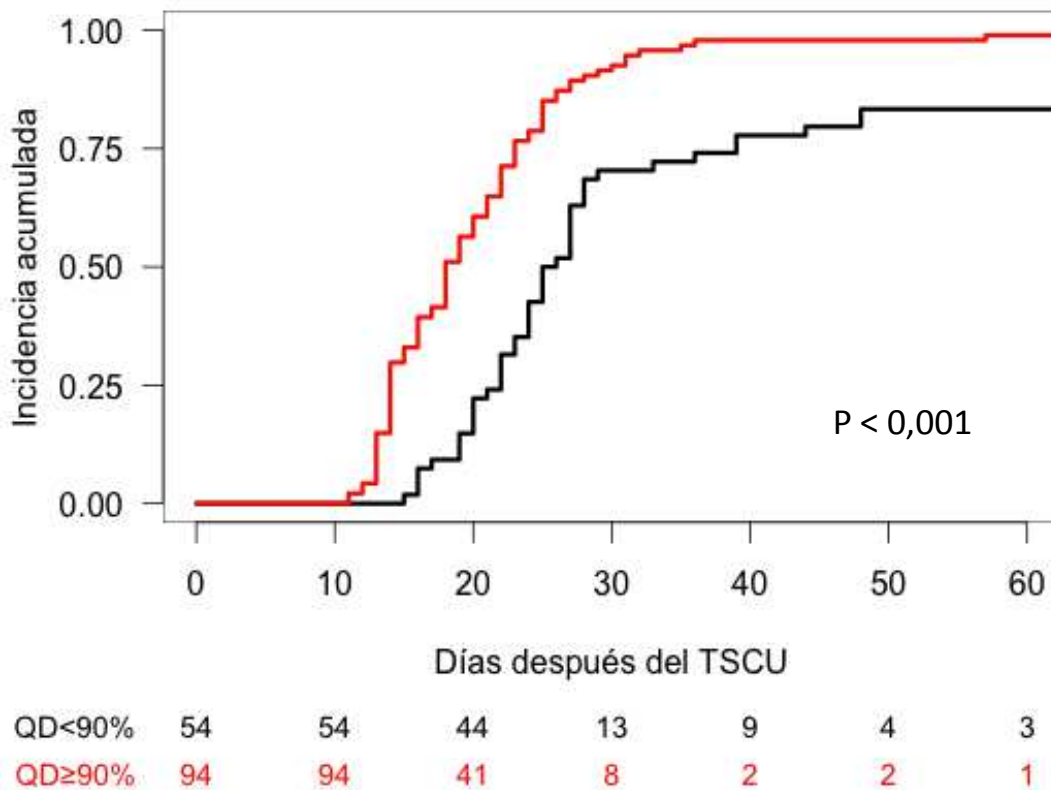


Figura 9. Incidencia acumulada de injerto mieloide en función del estado del quimerismo, mixto o completo

La probabilidad de injerto mieloide fue disminuyendo conforme los puntos de corte para el resultado del quimerismo se fueron bajando tal y como se aprecia en la Figura 10. Si bien la mediana de días para los pacientes que alcanzaban injerto se mantenía más o menos constante, en torno a unos 25 días, la incidencia acumulada de injerto bajaba hasta tan sólo el 50% para valores de quimerismo inferiores al 60% en el día 14 tras el trasplante. Puntos de corte establecidos por debajo de esta cifra de 60% no mostraron ya cambios en la probabilidad de injerto, incluyendo sólo un número muy pequeño de pacientes.

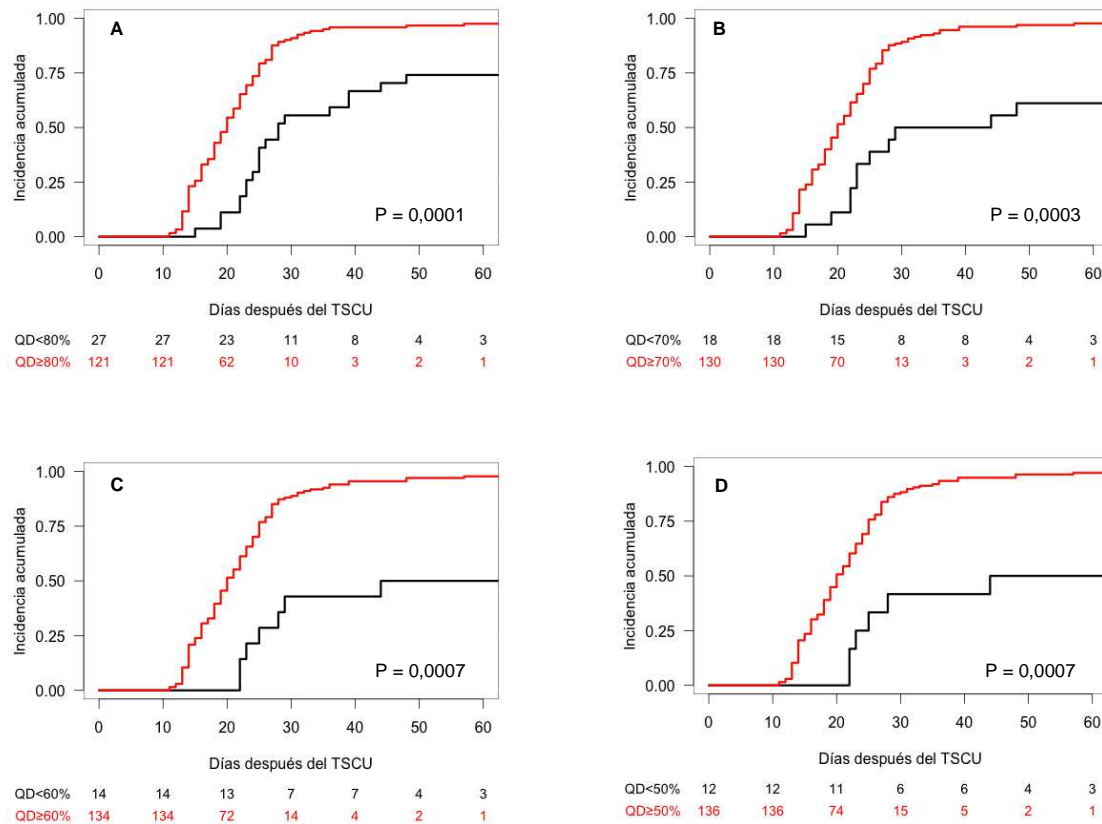


Figura 10. Incidencia acumulada de injerto mieloide en función del resultado del quimerismo en el día 14 tras el TSCU

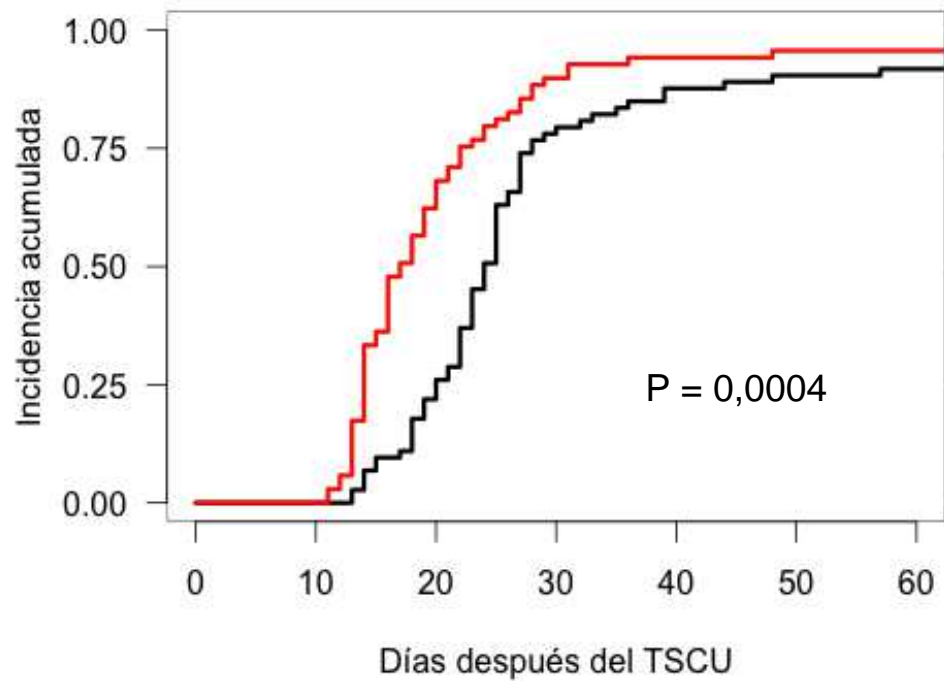
Además de los resultados del quimerismo, otras variables como el sexo varón, un peso del receptor mayor a 70 kg, un diagnóstico distinto a leucemia aguda, el estado seropositivo para CMV y el uso de micofenolato para la profilaxis de la EICH se asociaron a una probabilidad de injerto mieloide más baja.

En la Tabla 21 se muestra la relación existente entre los datos de celularidad de las unidades de cordón umbilical y la incidencia acumulada de injerto mieloide. De forma general, todos los tipos celulares, principalmente células CD34+ y linfocitos T, se relacionaron con la probabilidad de injerto.

Tabla 21. Celularidad de la unidad de SCU e injerto mieloide

Variables	Categoría Desfavorable	Mediana (días)	CI a 60 días (%)	Test de Gray
CNT x 10 ⁷ /kg infundidas	< 2,5	19 – 22	96 vs. 91	0,01
CD34 x 10 ⁵ /kg criopreservación	< 1,2	19 – 24	96 vs. 85	0,004
CD34 x 10 ⁵ /kg infundidas	< 1,4	16 – 24	96 vs. 92	0,0004
CFU-GM x 10 ⁴ /kg criopreservación	< 2,2	20 – 23	98 vs. 88	0,04
CFU-GM x 10 ⁴ /kg infundidas	< 5	11 – 21	100 vs. 91	0,0002
CD3 x 10 ⁶ /kg infundidas	< 6	19 – 22	99 vs. 87	0,0008
CD4 x 10 ⁶ /kg infundidas	< 4,2	19 – 22	97 vs. 89	0,01
CD8 x 10 ⁶ /kg infundidas	< 1,6	19 – 22	98 vs. 87	0,003
CD19 x 10 ⁶ /kg infundidas	< 2,6	16 – 22	95 vs. 92	0,02
CD56 x 10 ⁶ /kg infundidas	< 3,5	16 – 22	97 vs. 92	0,0007

En la Figura 11 y la Figura 12 se muestra la incidencia acumulada de injerto en función del número de células CD34+ y linfocitos T infundidos.



CD34+ ≤ 1,4x105/Kg	73	73	56	14	7	3	2
CD34+ > 1,4x105/Kg	69	69	26	7	4	3	2

Figura 11. Incidencia acumulada de injerto mieloide en función de la dosis de células CD34+ infundidas

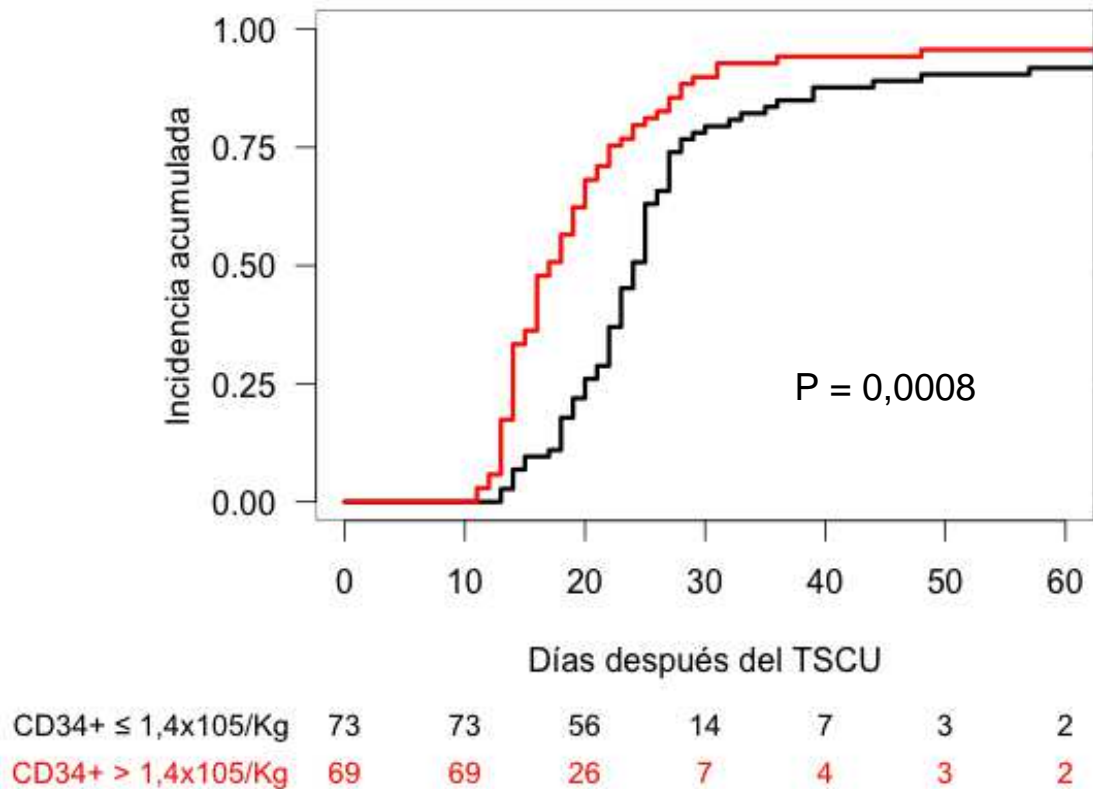


Figura 12. Incidencia acumulada de injerto mieloide en función de la dosis de células CD3+ infundidas

5.3.3. Análisis multivariante del injerto mieloide

De todos los factores analizados sólo el quimerismo hematopoyético y la cifra de linfocitos T infundidos se asociaron de forma independiente con la probabilidad de injerto mieloide (Tabla 22)

Tabla 22. Análisis multivariante de injerto mieloide

Variables	HR (95% IC)	Valor de P Test de Fine and Gray
Quimerismo en el día +14	1,03 (1,02 - 1,05)	< 0,0001
CD3+ infundidas x 10 ⁶ por kg	2,53 (1,48 - 4,33)	0,0007

5.3.4. Correlación entre los distintos subtipos celulares

Los distintos subtipos celulares infundidos mostraron una correlación positiva entre ellos. En la Tabla 23 se muestran los niveles de correlación entre las poblaciones celulares más importantes para el injerto. Los niveles de CNT infundidos tuvieron un buen nivel de correlación con las células CD34+ (coeficiente de 0,640; P < 0,001) y linfocitos T (coeficiente de 0,639; P < 0,001). Sin embargo, la correlación positiva entre las cifras infundidas de células CD34+ y de linfocitos T fue moderada, con un coeficiente Rho de Spearman de 0,420 (P < 0,001).

Tabla 23. Correlación entre los subtipos celulares de las unidades de SCU

Correlación	Coefficiente de Correlación	Valor de P
CNT x 10 ⁷ /kg infundidas vs. CD34 x 10 ⁵ /kg infundidas	0,640	< 0,001
CNT x 10 ⁷ /kg infundidas vs. CD3 x 10 ⁶ /kg infundidas	0,639	< 0,001
CD34 x 10 ⁵ /kg infundidas vs. CD3 x 10 ⁶ /kg infundidas	0,420	< 0,001

En la Figura 13, Figura 14 y Figura 15 se muestran los gráficos de correlación de las distintas poblaciones celulares infundidas.

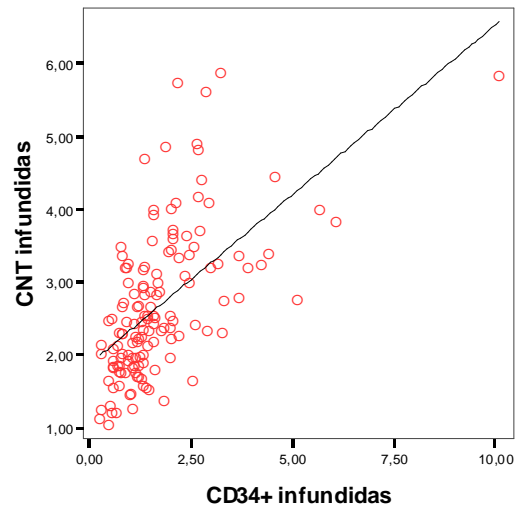


Figura 13. Correlación entre las CNT y las células CD34+ infundidas

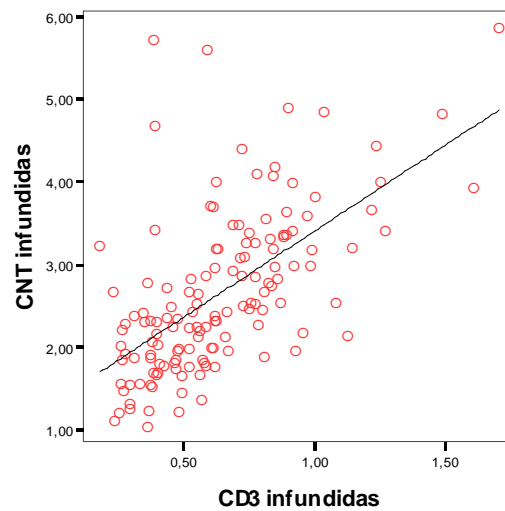


Figura 14. Correlación entre las CNT y las células CD3+ infundidas

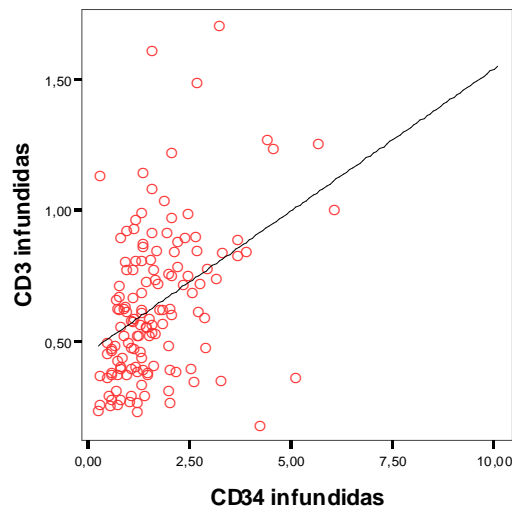


Figura 15. Correlación entre las células CD34+ y las células CD3+ infundidas

5.4 FALLO PRIMARIO DE INJERTO

5.4.1. Descripción del fallo primario de injerto

Siete pacientes no llegaron a alcanzar injerto mieloide tras sobrevivir más de un mes. Estos pacientes fueron considerados como fallos primarios de injerto y representan un 5% de la población de estudio. Seis de los siete pacientes (86%) con fallo de injerto primario fallecieron. El único paciente que sobrevivió lo hizo tras ser rescatado con un trasplante de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica de donante familiar haploidéntico con depleción T. Actualmente está aún vivo a los 5 años del TSCU.

5.4.2. Análisis univariante para fallo de injerto primario

En la Tabla 24 se describen los principales factores asociados a la presencia de fallo de injerto primario. El estado del quimerismo al día 14 después del TSCU tuvo una marcada influencia en el desarrollo de un fallo de injerto primario. Seis de los siete pacientes en los que el injerto falló tenían una quimera mixta al día +14 del trasplante.

Tabla 24. Análisis univariante de factores de riesgo para fallo de injerto

Variables	Mediana (extremos)	n (%)	VALOR DE P
Quimera 90%			
<90		6/54 (11)	0,02
≥90		1/94 (1)	
Quimera 80%			
<80		6/27 (22)	< 0,001
≥80		1/121 (0.8)	
Quimera 70%			
<70		6/18 (33)	< 0,001
≥70		1/130 (0.7)	
Quimera 60%			
<60		6/14 (43)	< 0,001
≥60		1/134 (0.7)	
Quimera 50%			
<50		6/12 (50)	< 0,001
≥50		1/136 (7)	
Diagnóstico LA			
LA		3/113 (3)	0,09
No LA		4/35 (11)	
Quimera día +14			
Fallo de injerto	36 (15 – 95)		< 0,001
Injerto	94 (0 – 100)		
Células CD34+ pre x 10⁵ por kg			
Fallo de injerto	1,15 (0,46 – 2,72)		0,07
Injerto	1,66 (0,27 – 6,76)		

La frecuencia de fallo de injerto primario fue incrementándose conforme el resultado del estudio de quimerismo mostraba una mayor proporción de material del receptor, de forma que para quimeras mixtas con niveles de material del donante inferiores al 50%, la tasa de fallo primario de injerto fue del 50%.

5.4.3. Análisis multivariante de fallo de injerto primario

Sólo el resultado del estudio del quimerismo al día 14 tras el TSCU se asoció de forma independiente a la tasa de fallo de injerto primario ($P < 0,001$).

5.5 INJERTO PLAQUETAR

5.5.1. Descripción del injerto plaquetar

De un total de 136 pacientes que alcanzaron injerto mieloide, 39 (29%) no llegaron a alcanzar injerto plaquetar y todos ellos fallecieron con una mediana de 68 días (extremos 13 – 306 días). Noventa y siete pacientes alcanzaron injerto plaquetar con una mediana de 47 días (extremos 27 – 41 días). La incidencia acumulada de injerto plaquetar fue del 69% a los 180 días tras el TSCU (Figura 16).

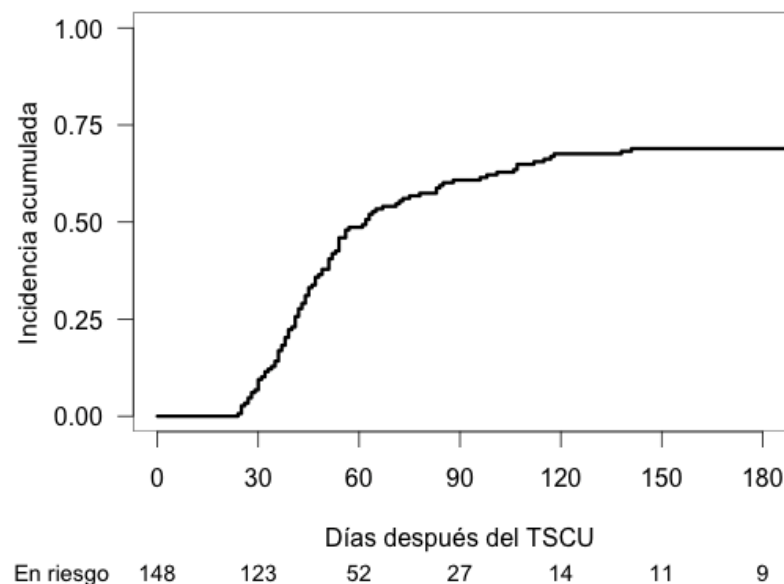


Figura 16. Incidencia acumulada de injerto plaquetar

5.5.2. Análisis univariante del injerto plaquetar

En la Tabla 25 se muestran las variables que se asociaron con la probabilidad y velocidad de injerto plaquetar. Al igual que sucedió con el injerto mieloide, tanto los resultados de los estudios de quimerismo en el día 14 tras el TSCU, como los datos de las dosis de algunos subtipos celulares infundidos, tuvieron valor pronóstico sobre la cinética y la probabilidad de injerto plaquetar.

Tabla 25. Factores del paciente relacionados con el injerto plaquetar

Variables	Punto de corte	Mediana (días)	Incidencia acumulada a 180 días (%)	Valor de P Test de Gray
Quimera	< 90%	54 vs. 44	66 vs. 70	0,3
	< 80%	56 vs. 45	56 vs. 72	0,06
	< 70%	59 vs. 45	44 vs. 72	0,03
	< 60%	67 vs. 45	43 vs. 72	0,06
	< 50%	78 vs. 46	42 vs. 71	0,07
Sexo D – R	M – H	51 vs. 45	55. vs. 76	0,01
Diagnóstico	No LA	61 vs. 46	54 vs. 74	0,03
CD3+ x 10⁶/kg infundidas	< 6	53 vs. 43	59 vs. 78	0,002
CD4+ x 10⁶/kg infundidas	< 4,2	52 vs. 43	64 vs. 73	0,06
CD8+ x 10⁶/kg infundidas	< 1,6	54 vs. 42	59 vs. 78	0,0006

En la Figura 17 se muestran las curvas de injerto plaquetar según los resultados del quimerismo al día 14 tras el TSCU. A diferencia del injerto mieloide, el hecho de presentar un quimerismo mixto no se correlacionó con la probabilidad de alcanzar injerto plaquetar ni con los días necesarios para ello. Sin embargo, niveles de material del donante por debajo del 80% sí que resultaron en una incidencia

acumulada de injerto plaquetar más baja y en una mediana de días más alta hasta alcanzar el injerto.

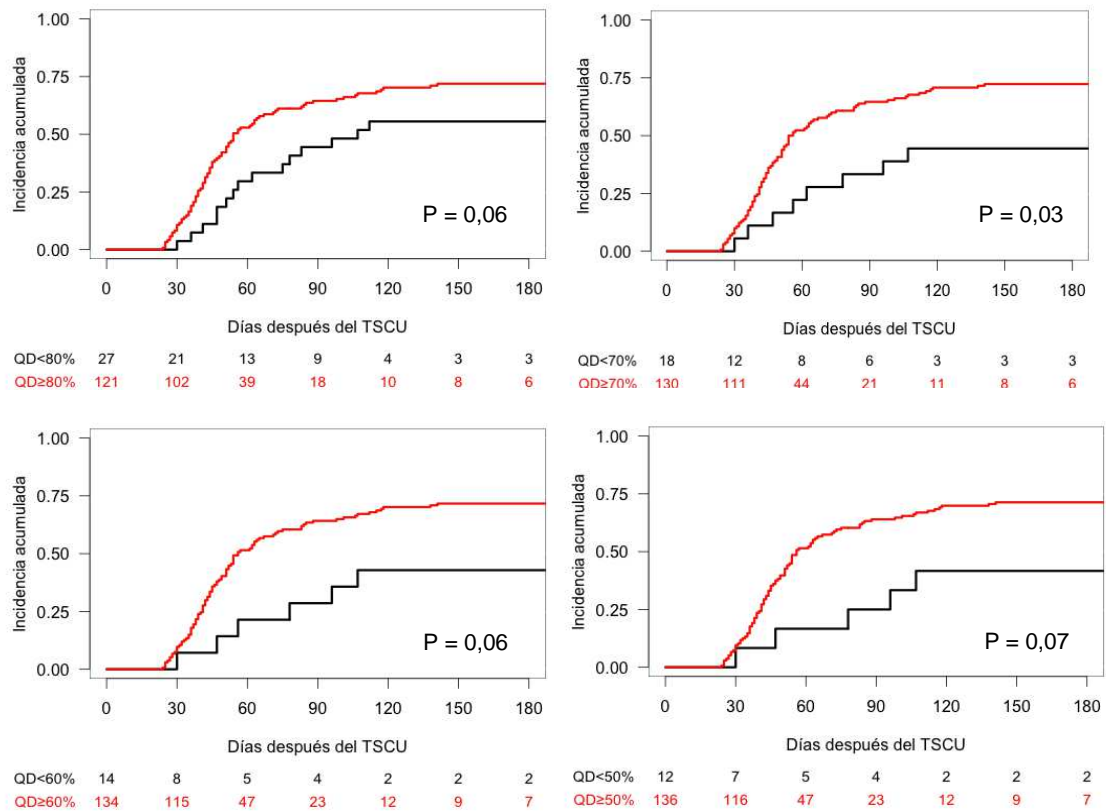


Figura 17. Incidencia acumulada de injerto plaquetar según el quimerismo a día 14 tras el trasplante

La dosis celular infundida también jugó un papel importante en el injerto plaquetar. No obstante, ni el número de células CD34+ del injerto, ni la CNT, ni las CFU mostraron influencia sobre el injerto plaquetar en esta serie. En su lugar, este dependió en gran medida de la dosis de linfocitos T utilizada, de forma que cuando las células CD3+ infundidas fueron menores de 6×10^6 por kg de peso del receptor, la incidencia acumulada de injerto plaquetar a los 180 días fue de 59% frente a 78% para dosis mayores, con una mediana de días hasta el injerto de 53 vs. 43 ($P = 0,002$). En la Figura 18 se muestra la probabilidad de injerto plaquetar en relación a la dosis de células CD3+ infundidas.

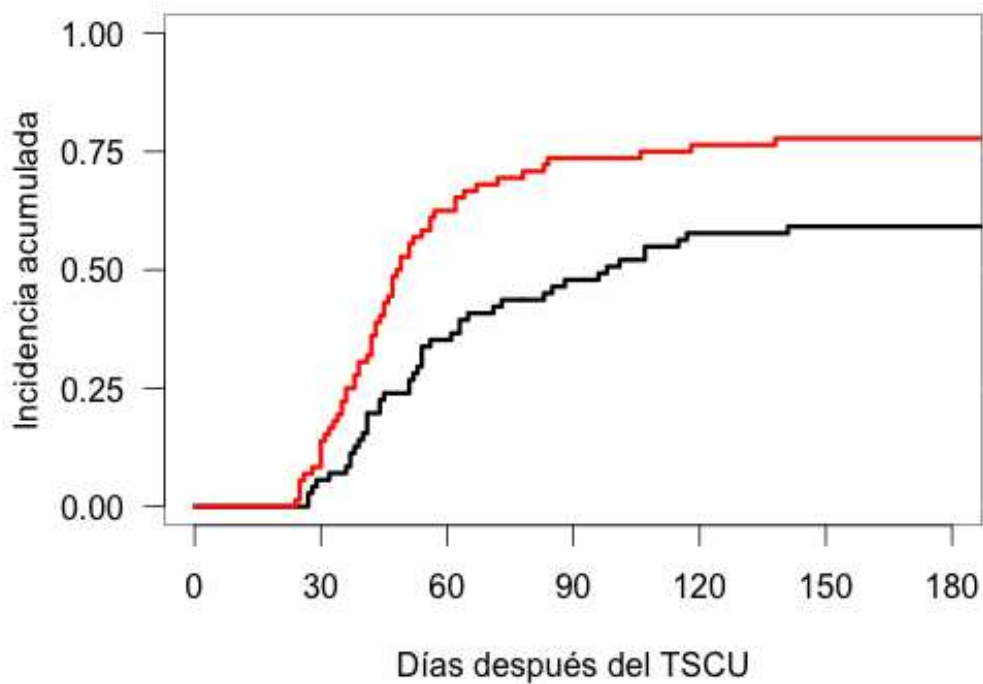


Figura 18. Incidencia acumulada de injerto plaquetar según la dosis de células CD3+ infundidas

De entre las subpoblaciones de linfocitos T, la dosis de linfocitos CD8+ infundida tuvo una marcada influencia en la probabilidad de injerto plaquetar. Aquellos pacientes que recibieron una dosis de células CD8+ menor de $1,6 \times 10^6$ por kg de peso, tuvieron una incidencia acumulada de injerto plaquetar del 59% frente al 78% ($P = 0,0006$). En la Figura 19 y en la Figura 20 se muestran las curvas de injerto plaquetar en función de las cifras de células CD4+ y CD8+ infundidas respectivamente.

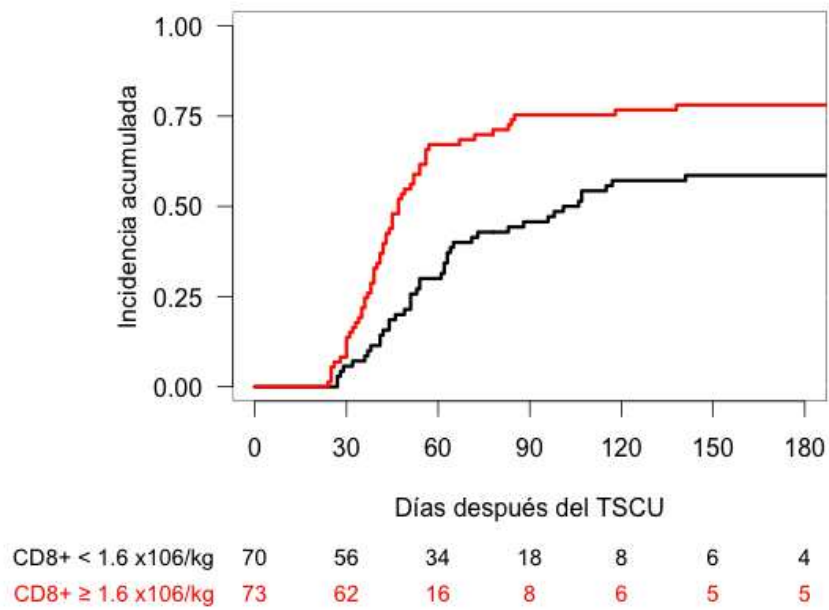


Figura 19. Incidencia acumulada de injerto plaquetar según la dosis de células CD4+ infundidas

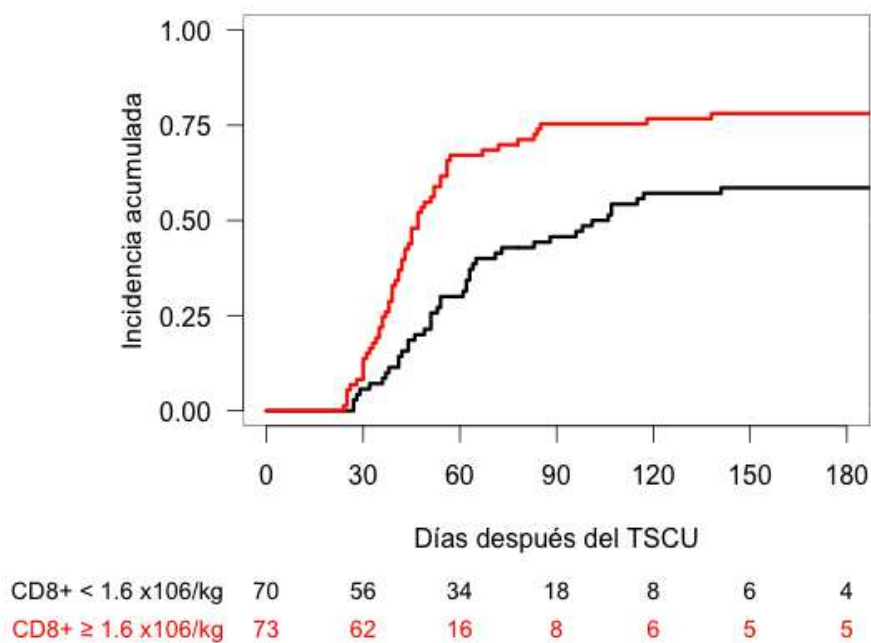


Figura 20. Incidencia acumulada de injerto plaquetar según la dosis de células CD8+ infundidas

De igual manera la relación entre el sexo de donante y receptor, en este caso mujer – hombre, y un diagnóstico distinto a leucemia aguda, resultaron en una incidencia acumulada menor de injerto plaquetar y en una mediana de días más prolongada hasta alcanzar dicho injerto. En la Figura 21 y la Figura 22 se muestran las curvas de injerto plaquetar en función de la relación donante – receptor y del diagnóstico respectivamente.

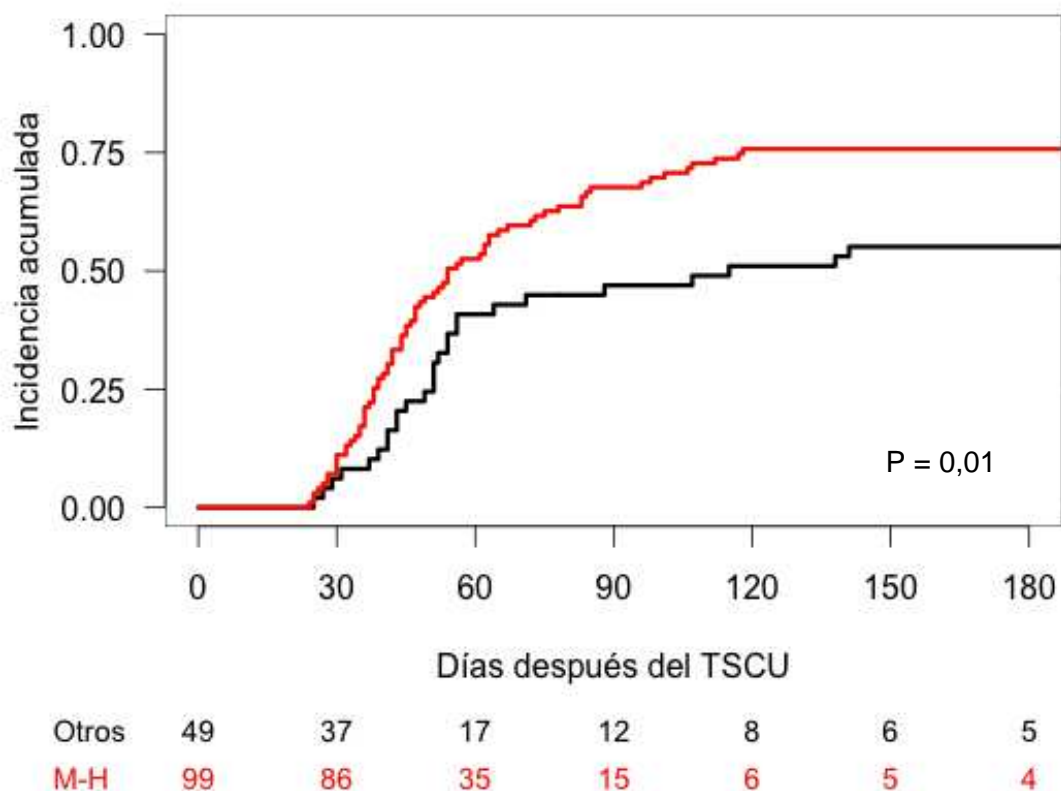


Figura 21. Incidencia acumulada de injerto plaquetar en función del sexo de donante y receptor

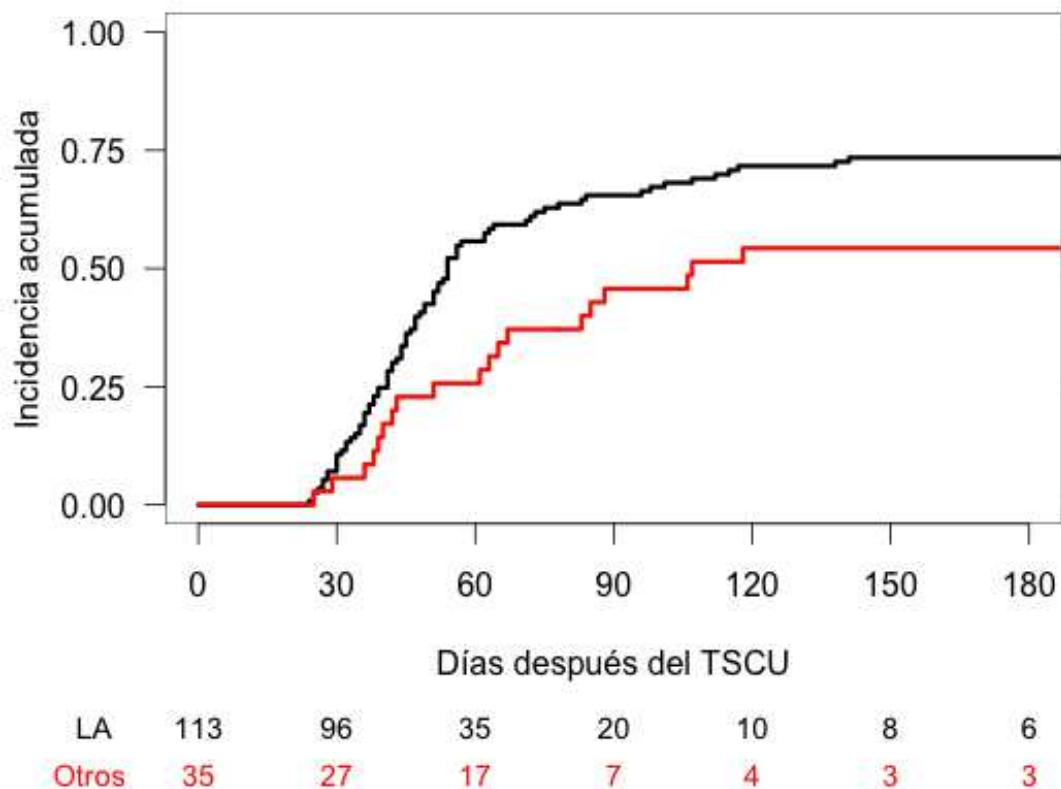


Figura 22. Incidencia acumulada de injerto plaquetar en función del diagnóstico

5.5.3. Análisis multivariante del injerto plaquetar

Tal y como se muestra en la Tabla 26, de todos los factores analizados sólo el quimerismo hematopoyético, la cifra de linfocitos T infundidos y la relación entre el sexo del donante y receptor se asociaron de forma independiente con la probabilidad de injerto plaquetar.

Tabla 26. Análisis multivariante de injerto plaquetar

Variables	HR (95% IC)	Valor de P Test de Fine and Gray
Sexo Donante – Receptor	0,51 (0,32 – 0,82)	< 0,005
Quimerismo día +14	1,013 (1,003 – 1,024)	0,01
Células CD3+ x 10⁶ por kg	1,098 (1,01 – 1,194)	0,03

5.6 ENFERMEDAD DEL INJERTO CONTRA EL HUÉSPED AGUDA

5.6.1. Descripción de la EICH aguda y análisis univariante de factores de riesgo

Sesenta y dos pacientes fueron diagnosticados de EICH aguda de grado II o superior con una mediana de 20 días (extremos 7 – 97 días). La incidencia acumulada de EICH aguda de grado II o superior fue de 43% a los 100 días tras el trasplante (Figura 23).

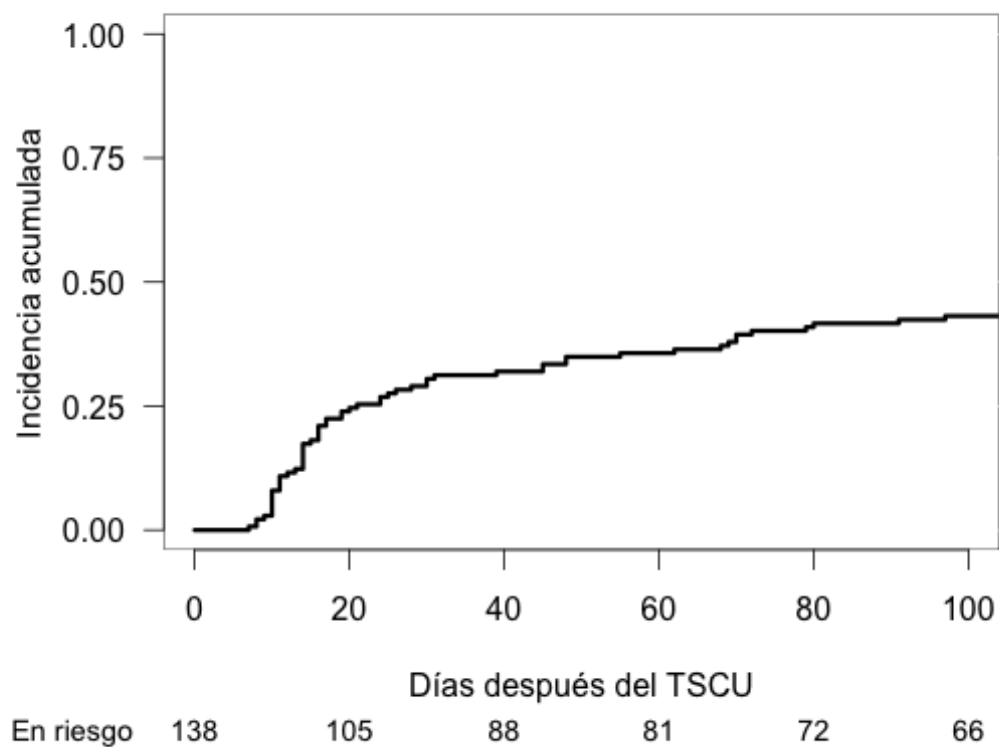


Figura 23. Incidencia acumulada de EICH aguda

En la Tabla 27 se muestran las variables que se relacionaron con un mayor riesgo de EICH aguda. Los resultados del quimerismo no se correlacionaron con el riesgo de EICH y ninguno de los puntos de corte analizados demostró una mayor incidencia de esta complicación (Figura 24).

Tabla 27. Análisis univariante de EICH aguda

Variables	Desfavorable	Incidencia acumulada a 100 días (%)	Valor de P Test de Gray
Quimera	< 90%	43 vs. 43	0,7
	< 80%	35 vs. 45	0,5
	< 70%	36 vs. 44	0,7
	< 60%	29 vs. 44	0,4
	< 50%	17 vs. 44	0,2
Diagnóstico	No LA	64 vs. 37	0,01
Incompatibilidad ABO	≠ Mayor	48 vs. 29	0,03
Linfoglobulina	Sí	67 vs. 42	0,01

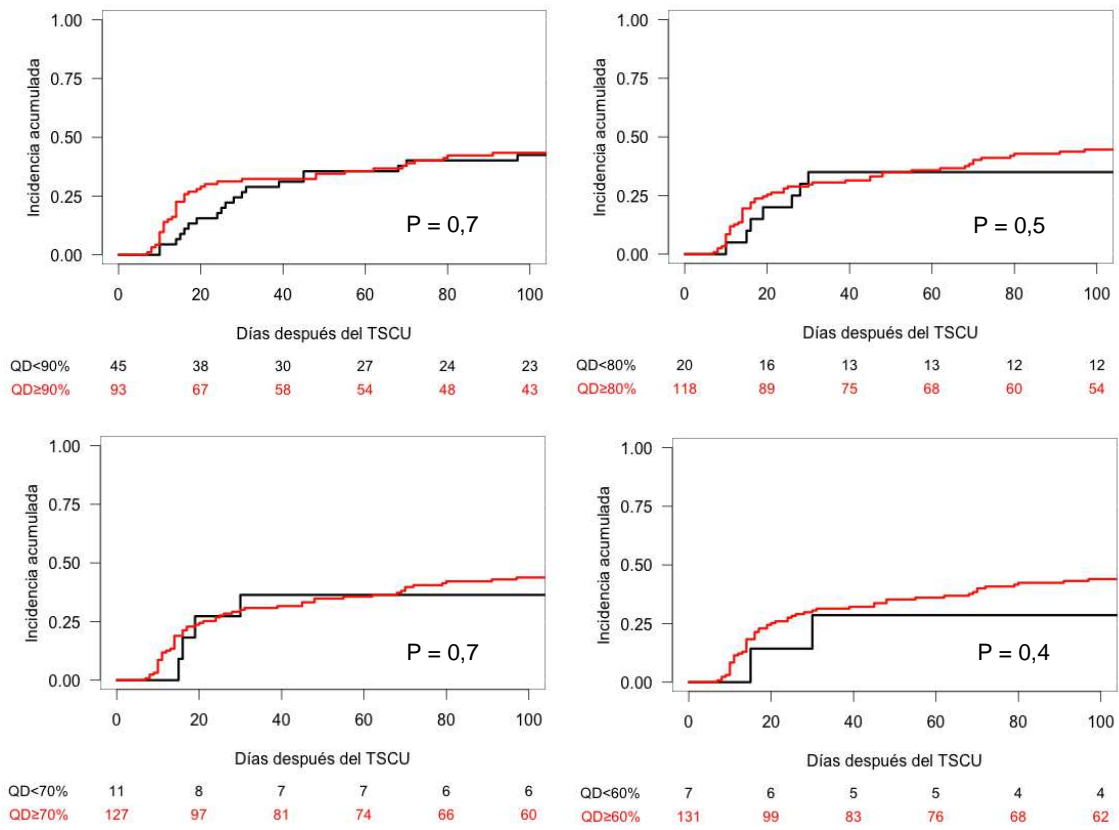


Figura 24. Incidencia acumulada de EICH aguda en función del quimerismo

El diagnóstico que motivó el trasplante y el esquema de acondicionamiento administrado fueron las principales variables asociadas con el riesgo de EICH aguda (Figura 25, Figura 26 y Figura 27). Los pacientes con un diagnóstico distinto al de leucemia aguda, aquellos sin incompatibilidad ABO o con incompatibilidad menor y los que recibieron linfoglobulina en lugar de timoglobulina en el régimen de acondicionamiento, presentaron una mayor probabilidad de desarrollar EICH aguda.

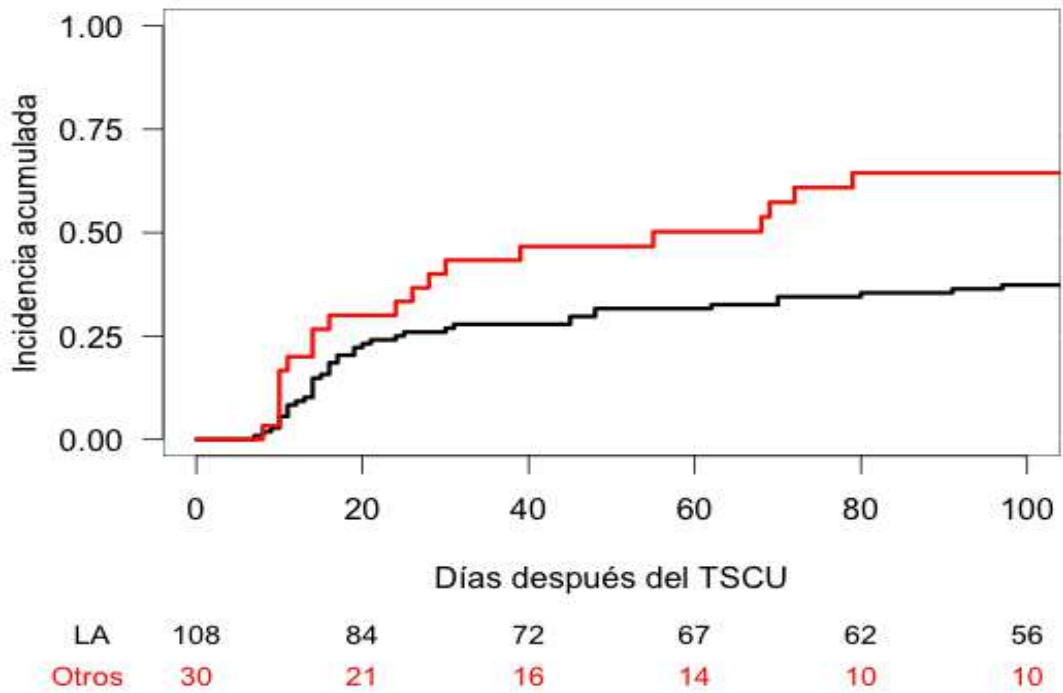


Figura 25. Incidencia acumulada de EICH en función del diagnóstico

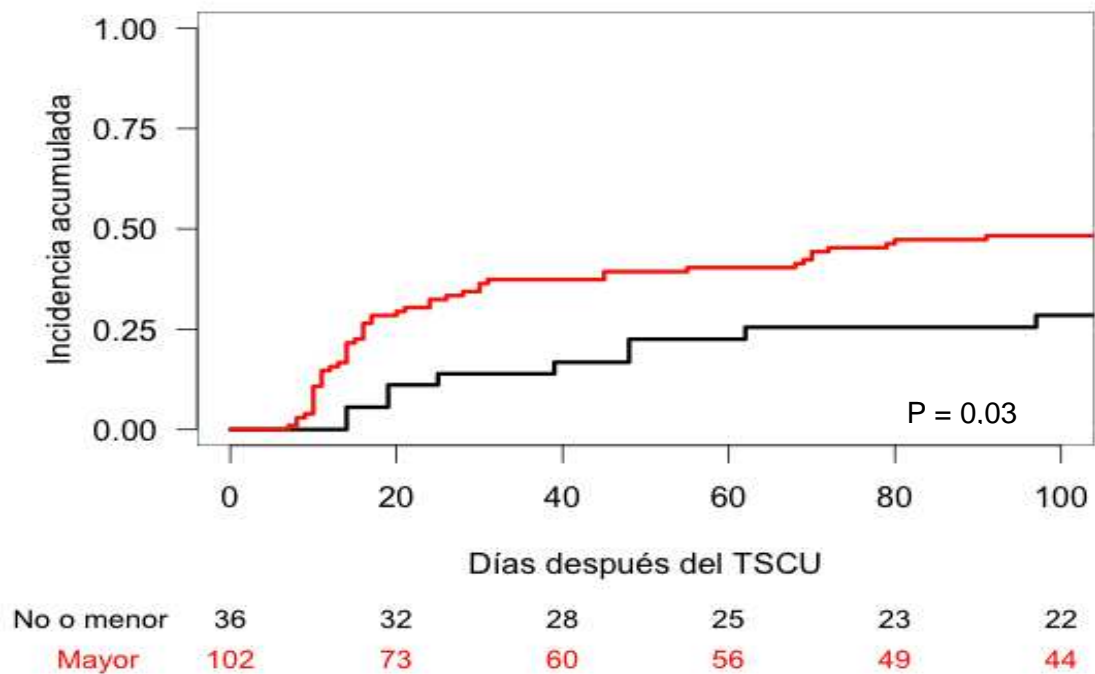


Figura 26. Incidencia acumulada de EICH en función de la incompatibilidad ABO

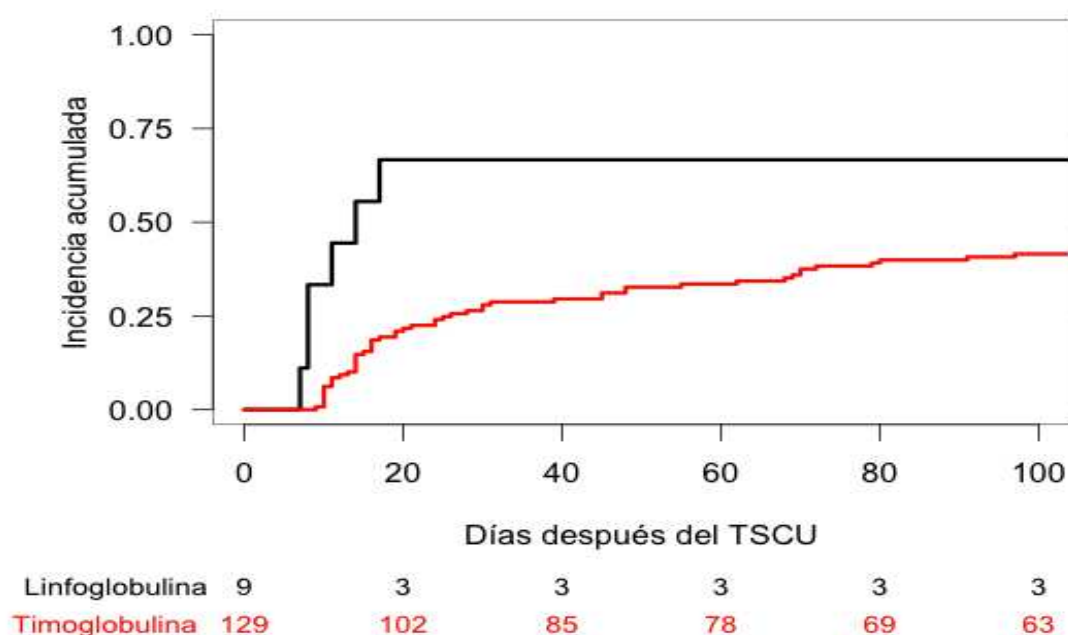


Figura 27. Incidencia acumulada de EICH en función del uso de linfoglobulina

5.6.2. Análisis multivariante de factores de riesgo de EICH aguda

En el análisis multivariante sólo el diagnóstico distinto a leucemia aguda ($P = 0,004$), la ausencia de incompatibilidad ABO mayor ($P = 0,02$) y el uso de linfoglobulina en lugar de timoglobulina ($P = 0,009$), se asociaron independientemente con el riesgo de EICH aguda (Tabla 28).

Tabla 28. Análisis multivariante de EICH aguda

Variables	HR (95% IC)	Valor de P Test de Fine and Gray
Diagnóstico distinto a LA	2,1 (1,28 – 3,45)	0,004
No incompatibilidad ABO mayor	2,25 (1,12 – 4,49)	0,02
Uso de linfoglobulina	3,32 (1,35 – 8,15)	0,009

5.7 MORTALIDAD RELACIONADA CON EL TRASPLANTE

5.7.1. Descripción de la MRT y análisis univariante de factores de riesgo

Setenta pacientes de los 148 (47%) fallecieron por causas relacionadas con el trasplante sin presentar previamente recidiva de la enfermedad. La incidencia acumulada de MRT a los dos años del TSCU fue del 46% (Figura 28).

En la Tabla 29 se muestran los resultados del análisis univariante de MRT. Sólo un diagnóstico distinto a una leucemia aguda y la infusión de una dosis de linfocitos CD8+ inferior a 1,6 millones por kg se asociaron con una MRT mayor.

Tabla 29. Análisis univariante de mortalidad relacionada con el trasplante

Variables	Punto de corte	Incidencia acumulada a 2 años (%)	Valor de P Test de Gray
Quimera	< 90%	42 vs. 49	0,5
	< 80%	35 vs. 49	0,3
	< 70%	33 vs. 48	0,4
	< 60%	36 vs. 48	0,6
	< 50%	33 vs. 48	0,5
Diagnóstico	No LA	42 vs. 63	0,02
Incompatibilidad ABO	≠ Mayor	39 vs. 57	0,08
CD3+ infundidos	< 4 x 10 ⁶	42 vs. 61	0,08
CD8+ infundidos	< 1,6 x 10 ⁶	37 vs. 57	0,03

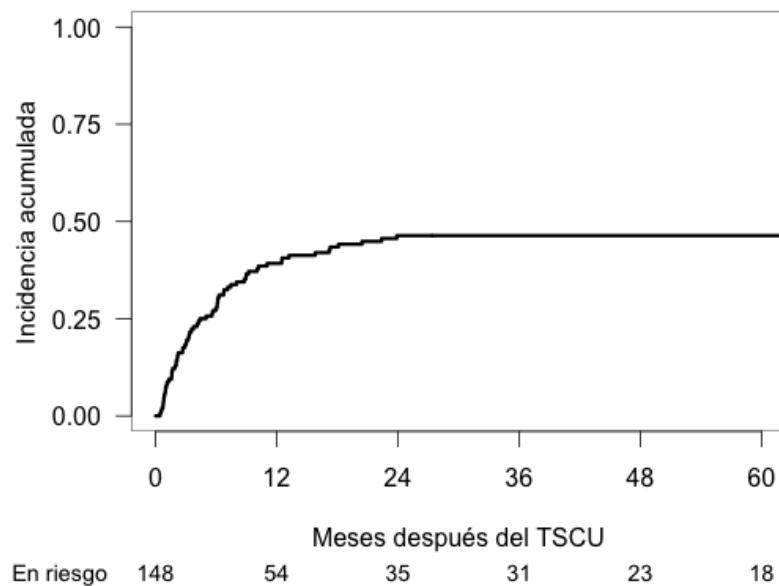


Figura 28. Incidencia acumulada de mortalidad relacionada con el trasplante

5.7.2. Análisis multivariante de MRT

En el análisis multivariante sólo la presencia de un diagnóstico distinto a una leucemia aguda fue un marcador independiente para una mayor MRT (Tabla 30). La Figura 29 muestra las diferencias en la probabilidad de MRT entre ambos grupos de pacientes. Se puede apreciar que en aquellos casos trasplantados con un diagnóstico distinto al de leucemia aguda, la incidencia de MRT alcanzó el 63% a los dos años. No hubo ninguna relación entre el quimerismo y la MRT.

Tabla 30. Análisis multivariante para mortalidad relacionada con el trasplante

Variables	HR (95% IC)	Valor de P Test de Fine and Gray
Diagnóstico leucemia aguda	1,84 (1,11 – 3,04)	0,02

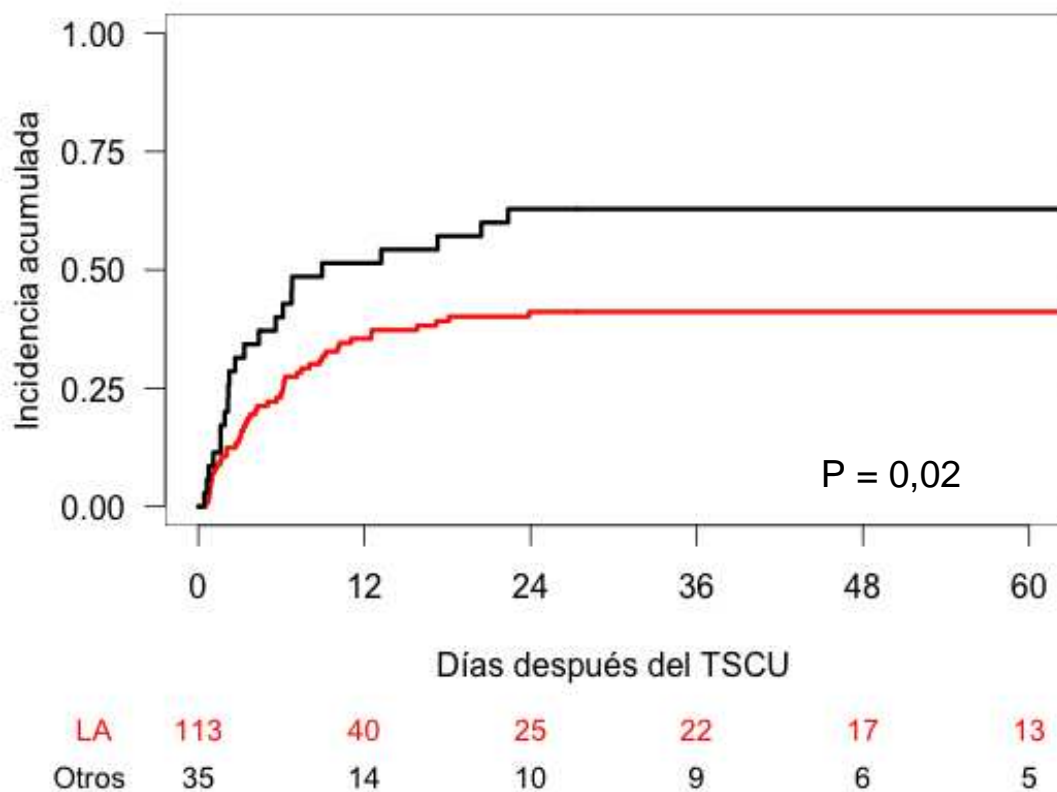


Figura 29. Incidencia acumulada de mortalidad relacionada con el trasplante en función del diagnóstico

6. DISCUSIÓN

El presente trabajo demuestra que el valor del quimerismo en médula ósea, obtenida 14 días tras el TSCU se asocia de manera independiente a la probabilidad y cinética del injerto hematopoyético. Esta asociación no se limita exclusivamente al injerto mieloide sino que abarca también al injerto plaquetar. Cabe destacar que, en este estudio, el quimerismo hematopoyético es el único parámetro postrasplante que se ha correlacionado con la tasa de fallo primario de injerto.

Los resultados de este estudio han revelado a su vez datos muy interesantes sobre la relación entre las características celulares del inóculo y la probabilidad de injerto hematopoyético. Clásicamente, se han utilizado la CNT o la cifra de células CD34+ como principales factores implicados en el injerto hematopoyético para guiar la selección de las unidades de cordón. Esta es la primera vez que, tras un análisis más completo, incluyendo los diferentes subtipos celulares más importantes contenidos en una unidad de cordón umbilical, la cifra de CD3+ infundida o, lo que es lo mismo, los linfocitos T que contiene el inóculo, tienen un papel muy importante en la probabilidad de injerto y en el tiempo necesario para alcanzarlo. Este hallazgo, novedoso en el campo del TSCU, se ha observado en otros tipos de trasplante en los que se ha practicado depleción linfocitaria y pone de manifiesto la importancia de los fenómenos inmunológicos en el post-trasplante inmediato, no sólo en lo que a EICH y recaída se refiere, sino también al injerto hematopoyético.

Los estudios previos sobre el estado del quimerismo como posible factor predictivo del injerto en trasplante hematopoyético se han centrado fundamentalmente en la detección de la pérdida de un injerto que fue inicialmente normofuncionante(100, 112-119), lo que vendría a corresponder con un fallo secundario de injerto. En pacientes en los que se alcanza un injerto hematopoyético adecuado tras trasplante de CPSP o de médula ósea de donante familiar HLA-idéntico, la detección de un quimerismo mixto con alto porcentaje de material del receptor o de un quimerismo mixto que va en aumento en estudios seriados, puede suponer la antesala de una pérdida del injerto, así como la anticipación o confirmación de una probable recidiva de la enfermedad. Sin embargo, los datos de la utilización de la información relativa al quimerismo hematopoyético con el fin de predecir un fallo primario de injerto son muy escasos y proceden en su mayoría de estudios de trasplante de sangre periférica o de médula ósea(12, 87). De hecho, hasta la fecha no disponemos de información acerca de este tipo de estudios en el contexto del TSCU. Los resultados de los trabajos realizados en TPH de sangre periférica o médula ósea, mostraron que pacientes con

quimerismo mixto en fases muy precoces del trasplante, tienen una alta incidencia de fallo primario de injerto. En el caso de estos trasplantes, un fallo primario de injerto es relativamente fácil de sospechar de forma temprana, sin embargo, esta asociación entre quimerismo precoz y fallo primario de injerto o retraso en la recuperación hematopoyética es de especial relevancia en el TSCU. Esto es debido a la característica susceptibilidad de este tipo de trasplantes para tener injertos tardíos y una mayor incidencia de fallo primario de injerto. El resultado del estudio del quimerismo en estos casos podría facilitar la instauración temprana de medidas terapéuticas.

El fallo primario de injerto es un evento temprano en el curso de un trasplante. Por eso, el análisis del quimerismo en nuestro estudio se realizó en el día +14. Aunque algunos estudios utilizando análisis en un único punto han sido capaces de predecir el fallo de injerto(115, 117), la monitorización longitudinal en el tiempo se ha sugerido como una posibilidad para mejorar e incrementar el valor clínico del quimerismo. Esta estrategia se aplica fundamentalmente en el trasplante con acondicionamiento de baja intensidad, para predecir el fallo de injerto secundario y la recaída y anticipar la aplicación de inmunoterapia, generalmente en forma de infusión de linfocitos del donante(119). Una monitorización más intensiva podría ser útil en los pacientes en alto riesgo de fallo de injerto para valorar intervenciones terapéuticas, pero son necesarios nuevos estudios para esclarecer si el análisis longitudinal del quimerismo en este grupo de pacientes, y para este objetivo concreto, es superior a una sola determinación puntual. De momento, en nuestro trabajo y en el caso concreto del TSCU, el estudio puntual en un momento determinado ha demostrado que se correlaciona bien con el fallo de injerto, si bien no podemos concluir que esta estrategia sea equiparable o mejor que un estudio seriado en el tiempo.

Es obvio que nuestro estudio adolece de algunas limitaciones y quizás una de las más llamativas es la ausencia del análisis de quimerismo en poblaciones celulares concretas. Esto podría haber incrementado ligeramente la sensibilidad de la prueba y haber ofrecido información acerca del papel de los distintos compartimentos celulares en el injerto. Sin embargo, la mayoría de pacientes presenta una hipocelularidad grave de la médula ósea en el día +14 del TSCU, por lo que la separación de subtipos celulares podía haber conducido a no obtener ADN suficiente para el estudio, como así se observó en algún caso (datos no mostrados). Debido a estas dificultades de carácter técnico, desechamos la posibilidad de realizar el estudio en subpoblaciones

de leucocitos y fue realizado exclusivamente en población celular total. Aún así, para el objetivo concreto de fallo primario de injerto, la sensibilidad parece ser suficiente con el estudio en población total. De hecho, el punto de corte para la definición de quimerismo mixto se estableció en 90%, muy por debajo de la sensibilidad de la técnica. Además, el riesgo de fallo de injerto fue claramente mayor con cifras de quimerismo que se encontraban muy por debajo del 90% y, en consecuencia, del nivel de sensibilidad de la prueba. Por tanto, parece suficiente el estudio en población celular total con el objetivo fundamental de detectar pacientes en alto riesgo de fallo de injerto, si bien, el estudio separado en población mieloide y linfoide T quizás aportaría información de interés.

La técnica elegida para el estudio del quimerismo puede considerarse como el estándar para este tipo de determinaciones, al menos en el momento de inicio del trabajo. Si bien la determinación de polimorfismos de un único nucleótido puede ser una buena alternativa hoy en día, el análisis de fragmentos (short tandem repeats) puede seguir siendo considerado como un estándar para la determinación del quimerismo en la práctica clínica por diversas razones. En el momento de seleccionar y poner a punto la técnica con la que se iba a llevar a cabo el estudio se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones: 1. Debería poder diferenciar entre donante y receptor en la totalidad de los casos; 2. Aunque con un grado de complejidad inevitable en este tipo de estudios, debería ser una técnica accesible al menos a centros terciarios que se dedican al TPH; 3. Debería contar con una buena sensibilidad pero, fundamentalmente, ofrecer la posibilidad de una cuantificación lo más real posible y con poca variabilidad inter-estudio. Estos criterios prácticamente limitaban el estudio del quimerismo a métodos basados en técnicas moleculares.

La FISH tiene una sensibilidad muy alta y una eficacia excelente para la cuantificación(67), no en vano es la única técnica en la que la cuantificación es directa, célula a célula. Sin embargo, su uso queda limitado a los trasplantes en los que existe disparidad de sexo entre donante y receptor, lo que en nuestro caso sólo representaba la mitad de la población. Esta desventaja impedía su utilización para la realización de este trabajo. Las nuevas técnicas de detección de polimorfismos de un único nucleótido (SNP) por PCR en tiempo real, tienen una mayor sensibilidad que la detección de STR pero más problemas de cuantificación, con coeficientes de variación entre 30% – 50%, fundamentalmente cuando el número de células autólogas es más alto(78, 79, 83, 85). Dado que la identificación de pacientes en alto riesgo de fallo de

injerto, se asocia a la persistencia de niveles relativamente altos de material del receptor, la sensibilidad del estudio de STR marcados con fluorocromos y con resolución de la PCR por electroforesis capilar, que se sitúa en torno a un 1 – 5%, resulta más que suficiente y aporta una eficacia en la cuantificación mucho mejor que la obtenida con el estudio de SNPs. Por todos estos motivos, el estudio de STR fue la técnica seleccionada para el análisis prospectivo del quimerismo. Otras técnicas ofrecen resultados variables, como la determinación de antígenos HLA(120, 121), sensibilidad y eficacia de cuantificación bajas, como la citogenética(61, 62), o se limitan a líneas celulares específicas, como el estudio de antígenos eritroides(63, 64), teniendo por tanto limitaciones importantes como para ser utilizadas como técnicas rutinarias en el estudio del quimerismo.

Además de su influencia en la incidencia acumulada de fallo de injerto, el valor del quimerismo fue determinante a la hora de identificar aquellos pacientes que presentaron un fallo primario de injerto. La incidencia de fallo primario de injerto fue sensiblemente mayor en pacientes con quimera mixta con independencia del punto de corte que se analizase. De hecho, seis de los siete pacientes que presentaron un fallo primario de injerto (86%), tenían un quimerismo mixto al día 14 tras el TSCU. La única variable independiente, predictora de este fallo de injerto en el análisis multivariante, fue el valor del quimerismo en el día 14 tras el trasplante. La frecuencia de fallo primario de injerto fue incrementándose conforme el resultado del estudio de quimerismo mostraba una proporción de material del receptor mayor, de forma que para quimeras mixtas con niveles de material del donante inferiores al 50% la tasa de fallo primario de injerto fue extremadamente elevada (50%).

El resultado del quimerismo fue también una variable independiente como factor predictivo de injerto plaquetar y de la velocidad de injerto. Sin embargo, el peso del quimerismo sobre el injerto plaquetar fue menos marcado que el que se observó sobre el injerto mieloide. Al menos en parte, este hecho podría deberse a la influencia de la mortalidad precoz, como evento competitivo en la incidencia acumulada de injerto plaquetar. Es bien sabido que no alcanzar o sufrir un retraso considerable en el injerto plaquetar supone un incremento de la morbilidad y mortalidad hemorrágica.

En nuestro estudio no encontramos una relación entre el quimerismo al día +14 y la incidencia acumulada de EICH aguda. En pacientes que reciben acondicionamientos mieloablativos la mediana de aparición de una EICH aguda está en torno a los 17 días(122). Por ello es posible una asociación entre el estado del

quimerismo y la incidencia de EICH aguda como ha sido observada por otros autores(123, 124). En el estudio de Hill et al.(123), los pacientes que presentaban un quimerismo mixto a partir del día +14 tenían una incidencia de EICH aguda menor que aquellos que presentaban un quimerismo completo desde el primer estudio. Sin embargo, estos pacientes con quimerismo mixto y menor incidencia de EICH no tenían una mayor tasa de recidivas, como en principio sería esperable. Desconocemos la razón por la que en nuestro trabajo el quimerismo mixto en día 14 tras el TSCU no se asoció con la incidencia de EICH aguda. Al margen de las limitaciones de tipo técnico, ya que el estudio no fue diseñado con este objetivo, cabe resaltar que muchos pacientes que inicialmente presentaron una quimera mixta en el día +14 lo hicieron con una alta proporción de material del donante (mayor al 80% en un 82% de los casos) y muchos de ellos evolucionaron posteriormente hacia una quimera completa, demostrando un injerto completamente inmunocompetente (datos no mostrados). Conforme el valor de material del donante era más bajo, se observaron diferencias más marcadas en la incidencia acumulada de EICH aguda a los 100 días, siendo del 29% y del 44% para los pacientes con quimera del donante inferior y superior al 60%, respectivamente. Desafortunadamente, el tamaño de la muestra para estos grupos con un quimerismo del donante tan bajo es muy pequeño como para poder mostrar significación estadística. No obstante, los datos sugieren que, de haber una relación entre el quimerismo y la EICH aguda tras TSCU, ésta se daría con niveles muy bajos de hematopoyesis del donante.

Como en otros muchos estudios, la dosis celular en nuestro trabajo tuvo un clarísimo impacto sobre la incidencia acumulada de injerto y sobre la mediana de días necesarios para alcanzarlo(125). Este aspecto ya lo habíamos observado de forma repetida en diversos estudios de nuestro grupo, manteniendo siempre su valor pronóstico a pesar de los cambios en la selección de unidades de cordón producidos a lo largo de los años. La selección de las unidades de SCU se ha basado principalmente en las dosis de CNT y células CD34+(11, 38, 126). Sin embargo, en este trabajo hemos analizado por primera vez el papel que otras poblaciones celulares pueden tener sobre el injerto hematopoyético, destacando por su importancia la dosis de linfocitos T infundidos. Hasta donde sabemos, este hallazgo no ha sido previamente reportado en el TSCU.

Si bien en el análisis univariante tanto la CNT, como la cifra de células CD34+ y los linfocitos T infundidos tuvieron una clara relación con el injerto, en el análisis

multivariante, sólo los linfocitos T aparecieron como variable con valor pronóstico independiente. Sin embargo, en nuestra opinión esto no resta valor a los otros dos parámetros de celularidad analizados. Los estudios de correlación muestran una correlación positiva y estadísticamente significativa entre las distintas celularidades estudiadas. Esta correlación es suficiente para interferir con los métodos de análisis multivariante, sin embargo, en el caso de las células CD34+ y CD3+ parece insuficiente para excluir un efecto independiente de ambas variables. Si repasamos la correlación entre la CNT y las células CD34+ y CD3+, observamos que en ambos casos existe una buena correlación positiva, con coeficientes de Rho-Spearman prácticamente idénticos (0,640 y 0,639, respectivamente). Es decir, si incrementamos el número de CNT en el injerto se incrementará de forma significativa el contenido del mismo en células CD34+ y CD3+. Por ello, en los estudios en los que existe discrepancia entre la CNT y las células CD34+ como variables independientes de injerto, dicha discrepancia podría deberse a la correlación que hay entre ambas variables. De hecho, ambas siguen utilizándose, generalmente en combinación, para seleccionar una unidad de cordón. Pero cuando analizamos la correlación entre las células CD34+ y CD3+, aunque existe una correlación positiva entre ambas, esta es sólo moderada, con un coeficiente de correlación de 0,420. Por tanto, un número elevado de células CD34+ en el injerto no implica necesariamente una cifra elevada de células CD3+. Este hecho también podría contribuir a explicar en parte los resultados discrepantes reportados entre CNT y células CD34+, ya que una dosis baja de células CD34+ puede verse compensada con cifras altas de linfocitos T maduros que faciliten el injerto.

El papel de los linfocitos T en el injerto hematopoyético ha sido demostrado en el trasplante con depleción T(127-131). En condiciones normales, tanto la médula ósea como la sangre periférica movilizada tienen una celularidad elevada, que en el caso de las células CD3+ se sitúa en un promedio entre 1 y 4×10^7 por kilogramo de peso del receptor, siendo 10 veces mayor en la sangre periférica movilizada con G-CSF ($\approx 10^8$ por kilogramo de peso del receptor)(127). Esto hace que en condiciones normales, y si no concurren otros factores de riesgo, la tasa de fallo de injerto en trasplantes no manipulados de donante hermano HLA-idéntico sea inferior al 1%. En estas condiciones no hay problemas para la facilitación del injerto por parte de los linfocitos T. Sin embargo, estos linfocitos T maduros también juegan un papel muy importante en la incidencia de EICH aguda, por lo que una de las estrategias para

prevenir esta complicación es la depleción T *ex-vivo* mediante el uso de anticuerpos monoclonales(127, 128). Hoy en día, está ampliamente demostrado que la reducción de los linfocitos T en el inóculo disminuye de forma drástica la incidencia de EICH aguda, aunque este efecto se ve contrarrestado por un incremento en el fallo primario de injerto, que puede ascender hasta tasas del 40% (128, 129). No hay una dosis establecida de linfocitos T a partir de la cual la incidencia de EICH aguda caiga de forma drástica, aunque en el caso de trasplantes de hermano HLA-idéntico esta dosis está alrededor de 10^5 por kilogramo de peso del receptor(132, 133). A partir de estos niveles de linfocitos T se empieza a ver una disminución de la EICH, pero también un aumento del fallo de injerto. Entre las estrategias para evitar el fallo de injerto destaca la de infundir una cifra alta de células CD34+, no inferior a 2×10^6 por kilogramo de peso del receptor y que puede alcanzar los 10^7 por kilogramo, en el caso de trasplantes haploidénticos o de DNE en los que la depleción T suele ser mayor (del orden de 10^3 o 10^4). Es decir, una forma de traspasar la barrera de histocompatibilidad cuando disponemos de pocos linfocitos T, es aumentar de forma importante la cifra de células CD34+ infundidas(134).

Si en todo este contexto analizamos las distintas celularidades contenidas en una unidad de SCU, podemos encontrar la explicación al importante papel que juegan los linfocitos T en el prendimiento del TSCU y que no se observa con otras fuentes no manipuladas. La celularidad contenida en un inóculo de SCU es significativamente baja en comparación a la médula ósea o la sangre periférica movilizada con G-CSF(25). En nuestro estudio fue 10 veces menor que la habitual con otras fuentes. Además, una dosis baja de células CD34+ no se ve compensada por una dosis elevada de células CD3+. A este respecto, las células CD3+ son 10 e incluso 100 veces menor a la habitual con otras fuentes de PH. Por tanto, podríamos decir que el TSCU representa un escenario de “depleción linfoide T moderada” en un contexto de células CD34+ muy bajas y que no pueden ser incrementadas. Todo ello lleva a pensar que el injerto y la cinética del mismo van a depender de un estrecho equilibrio entre estos dos tipos celulares. Si las células del donante no consiguen un control relativamente rápido de la hematopoyesis residual del receptor, lo que puede analizarse mediante los estudios de quimeras, el paciente entrará en una situación de alto riesgo de fallo de injerto.

Como hemos comentado más arriba, varios estudios han demostrado el impacto de la dosis celular en el injerto tras TSCU, tanto en niños como en adultos(10,

31, 135-137). Sin embargo, el mejor indicador de la dosis celular sigue sin estar bien establecido. En algunos trabajos la CNT ha resultado un buen marcador de injerto(31, 135, 136) mientras que en otras ocasiones el número de células CD34+ infundidas, o el número de colonias formadoras de unidades granulocito y macrófago, resultan mejores predictores de la evolución del paciente(33, 137). Debido a que la cuantificación del número de células CD34+ no está estandarizada, dificultando la comparación entre distintos laboratorios, su valor como indicador de la calidad de sangre de cordón al momento de la criopreservación y su uso para seleccionar una unidad para el trasplante todavía es aún materia de controversia(125). En nuestro estudio, la cuantificación de las células CD34+ y CD3+ previa a la infusión se ha realizado en un único laboratorio, superando las dificultades derivadas de la variación interlaboratorios de los estudios multicéntricos. En estas condiciones, se pone de manifiesto que la dosis de células CD3+ tiene una influencia fundamental en el injerto hematopoyético tras TSCU. No podemos afirmar que determinando la CNT como predictor de injerto estemos en realidad valorando de forma indirecta dos compartimentos celulares clave, como son las células CD34+ y CD3+, aunque nuestros resultados sugieren que puede ser así. En todo caso, y dadas las muchas peculiaridades de la SCU como fuente de progenitores hematopoyéticos, quizás debería hacerse un estudio más completo de estas unidades en el momento de la criopreservación, incluyendo poblaciones linfocitarias, que permitiese una selección aún más apropiada de la unidad de cordón.

Resulta llamativo que, en el análisis de factores de riesgo para presentar un quimerismo mixto en el día 14 tras el TSCU, sólo las células CD34+ tuvieron una clara influencia sobre la incidencia de quimerismo mixto. Los linfocitos T en este caso no resultaron predictores de un quimerismo mixto al día +14, con medianas muy similares entre los pacientes que presentaron quimerismo mixto o completo. Cuando se analiza la correlación entre la hematopoyesis residual del receptor y la cifra de células CD3+ infundidas, dicha correlación no es estadísticamente significativa, con un Rho de Spearman de tan sólo 0,139. Este hecho refuerza el papel de las células CD3+ como variable independiente del quimerismo a la hora de predecir el injerto hematopoyético. En el caso de las células CD34+, en cambio, se observó una correlación positiva y significativa desde el punto de vista estadístico, pero en un grado muy bajo, presentando un valor de Rho de Spearman de tan sólo 0,268 ($P = ,001$). En cierto modo, esto viene a explicarnos que el quimerismo está midiendo lo que realmente

ocurre en el trasplante una vez éste está en marcha, con independencia de la dosis celular que hayamos infundido, si bien ésta tiene una influencia importante sobre el injerto hematopoyético.

El quimerismo no pareció estar asociado con la MRT, lo que resulta completamente lógico ya que sólo resultó un buen predictor del fallo de injerto, y la incidencia de esta complicación en nuestra serie no fue muy alta. Además, aproximadamente un 25% de los pacientes con fallo de injerto, puede ser rescatado con trasplante de donante haploidéntico con depleción linfóide T (datos no mostrados). Todo esto hace que no pueda establecerse una asociación entre un valor puntual del quimerismo y la MRT.

Desde el punto de vista clínico, las opciones terapéuticas en el caso de fallo de injerto tras TSCU son muy escasas y quedan prácticamente limitadas a la realización de un segundo trasplante, decisión que en condiciones normales suele tomarse tras un largo periodo de neutropenia. La identificación de pacientes en alto riesgo de fallo de injerto, a través del estado de su quimerismo, puede ayudar a la hora de poner en marcha los mecanismos necesarios para un segundo trasplante. En estos casos y cuando no se dispone de un inóculo autólogo de reserva, la planificación de un trasplante de rescate mediante la búsqueda de un donante alternativo es recomendable, por si finalmente no se produce el injerto proceder al rescate sin demora. De forma adicional, en aquellos pacientes con escaso material del donante en el estudio de quimerismo, puede optarse por suspender toda la terapia inmunosupresora. Algunos estudios sugieren que la reducción o retirada de la inmunosupresión en el manejo de pacientes con quimerismo mixto podría mejorar la probabilidad de injerto(118, 138).

En resumen, el quimerismo hematopoyético precoz, en el día +14 del TSCU, se correlaciona con la cinética del injerto mieloide y plaquetar y con la incidencia de fallo primario de injerto tras trasplante de una unidad de cordón umbilical para pacientes adultos con hemopatías malignas. La probabilidad final de injerto va disminuyendo conforme el porcentaje de hematopoyesis residual del huésped se va incrementando. Entre los factores pre-trasplante, la dosis celular sigue teniendo un peso clave en todos los parámetros del injerto, y debe ser tenida en cuenta a la hora de seleccionar la unidad de SCU. Sin embargo, no queda claro cuál es el subtipo celular que más peso tiene para predecir el injerto. Nuestros datos sugieren que la dosis de células CD3+ puede ser tan importante como la dosis de células CD34+. Toda esta

información podría ser útil en la selección de unidades de SCU y para poner en marcha una estrategia de anticipación ante un posible fallo de injerto.

7. CONCLUSIONES

Las conclusiones fundamentales de este proyecto de tesis doctoral, centrado en el análisis del quimerismo hematopoyético precoz y su relación con las características del injerto hematopoyético, así como el papel de otros factores potencialmente implicados en este evento, son las siguientes:

1. El estado del quimerismo hematopoyético en el día 14 post-TSCU se correlaciona con la probabilidad de fallo primario de injerto. Niveles bajos de quimerismo del donante se asociaron con altas tasas de fallo de injerto, que van incrementándose conforme la proporción de médula del donante es mayor. Este es el único factor que en el análisis multivariante se asoció con la tasa de fallo de injerto.
2. El estado del quimerismo hematopoyético en el día 14 post-TSCU se correlaciona con la velocidad de la recuperación de la neutropenia. Niveles bajos de quimerismo del donante se asociaron con medianas más altas en la recuperación de la neutropenia.
3. El estado del quimerismo hematopoyético en el día 14 post-TSCU se correlaciona con la velocidad de la recuperación de la trombopenia. Niveles bajos de quimerismo del donante se asociaron con medianas más altas en la recuperación de la trombopenia.
4. Nuestros datos destacan la importancia de los linfocitos T en el injerto hematopoyético. Quizás sería recomendable disponer de las poblaciones linfocitarias de la unidad de SCU en el momento de la criopreservación.
5. No hemos encontrado relación entre el quimerismo en el día +14 del TSCU y la incidencia de EICH aguda o la MRT
6. Los datos referentes al quimerismo y al injerto hematopoyético pueden facilitar el manejo de los pacientes que reciben un TSCU, al identificar pacientes en riesgo de fallo de injerto y permitir adoptar estrategias anticipatorias.

8. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Jacobson LO, Marks EK, et al. The role of the spleen in radiation injury. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1949 Apr;70(4):740-2. PubMed PMID: 18149489.
2. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst.* 1951 Aug;12(1):197-201. PubMed PMID: 14874130.
3. Thomas ED, Lochte HL, Jr., Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest.* 1959 Oct;38:1709-16. PubMed PMID: 13837954. Pubmed Central PMCID: 444138.
4. Bortin MM. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation.* 1970 Jun;9(6):571-87. PubMed PMID: 4911417.
5. Billingham RE, Silvers WK. The induction of tolerance of skin homografts in rats with pooled cells from multiple donors. *J Immunol.* 1959 Dec;83:667-79. PubMed PMID: 13800712.
6. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey lectures.* 1966;62:21-78. PubMed PMID: 4875305.
7. Hansen JA, Clift RA, Thomas ED, Buckner CD, Storb R, Giblett ER. Transplantation of marrow from an unrelated donor to a patient with acute leukemia. *N Engl J Med.* 1980 Sep 4;303(10):565-7. PubMed PMID: 6995837.
8. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl*

- J Med. 1989 Oct 26;321(17):1174-8. PubMed PMID: 2571931. Epub 1989/10/26. eng.
9. Laporte JP, Gorin NC, Rubinstein P, Lesage S, Portnoi MF, Barbu V, et al. Cord-blood transplantation from an unrelated donor in an adult with chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med*. 1996 Jul 18;335(3):167-70. PubMed PMID: 8657214. Epub 1996/07/18. eng.
10. Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, Koc ON, Rizzieri DA, Wagner JE, et al. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med*. 2001 Jun 14;344(24):1815-22. PubMed PMID: 11407342. Epub 2001/06/16. eng.
11. Sanz GF, Saavedra S, Planelles D, Senent L, Cervera J, Barragan E, et al. Standardized, unrelated donor cord blood transplantation in adults with hematologic malignancies. *Blood*. 2001 Oct 15;98(8):2332-8. PubMed PMID: 11588027. Epub 2001/10/06. eng.
12. Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G, Printz D, Peters C, Matthes S, et al. Kinetics of chimerism during the 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 Dec;13(12):2059, 60-9. PubMed PMID: 10602430. Epub 1999/12/22. eng.
13. Campagnoli C, Fisk N, Overton T, Bennett P, Watts T, Roberts I. Circulating hematopoietic progenitor cells in first trimester fetal blood. *Blood*. 2000 Mar 15;95(6):1967-72. PubMed PMID: 10706862. Epub 2000/03/09. eng.
14. Shields LE, Andrews RG. Gestational age changes in circulating CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells in fetal cord blood. *Am J Obstet Gynecol*. 1998 May;178(5):931-7. PubMed PMID: 9609562. Epub 1998/06/03. eng.

15. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, Ribeiro RC, Graves V, Yoder M, et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 May 1;89(9):4109-13. PubMed PMID: 1373894. Pubmed Central PMCID: 525642. Epub 1992/05/01. eng.
16. Scaradavou A, Carrier C, Mollen N, Stevens C, Rubinstein P. Detection of maternal DNA in placental/umbilical cord blood by locus-specific amplification of the noninherited maternal HLA gene. *Blood*. 1996 Aug 15;88(4):1494-500. PubMed PMID: 8695871. Epub 1996/08/15. eng.
17. Poli F, Sirchia SM, Scalamogna M, Garagiola I, Crespiatico L, Pedranzini L, et al. Detection of maternal DNA in human cord blood stored for allotransplantation by a highly sensitive chemiluminescent method. *J Hematother*. 1997 Dec;6(6):581-5. PubMed PMID: 9483193. Epub 1998/03/04. eng.
18. Broxmeyer HE, Cooper S, Hass DM, Hathaway JK, Stehman FB, Hangoc G. Experimental basis of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Nov;44(10):627-33. PubMed PMID: 19802026. Epub 2009/10/06. eng.
19. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 May;86(10):3828-32. PubMed PMID: 2566997. Pubmed Central PMCID: 287234. Epub 1989/05/01. eng.
20. Broxmeyer HE, Kurtzberg J, Gluckman E, Auerbach AD, Douglas G, Cooper S, et al. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells

in human clinical transplantation. *Blood Cells*. 1991;17(2):313-29. PubMed PMID: 1680502. Epub 1991/01/01. eng.

21. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med*. 1996 Jul 18;335(3):157-66. PubMed PMID: 8657213. Epub 1996/07/18. eng.

22. Rocha V, Cornish J, Sievers EL, Filipovich A, Locatelli F, Peters C, et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood*. 2001 May 15;97(10):2962-71. PubMed PMID: 11342418. Epub 2001/05/09. eng.

23. Rocha V, Wagner JE, Jr., Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM, et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med*. 2000 Jun 22;342(25):1846-54. PubMed PMID: 10861319. Epub 2000/06/22. eng.

24. Barker JN, Davies SM, DeFor T, Ramsay NK, Weisdorf DJ, Wagner JE. Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. *Blood*. 2001 May 15;97(10):2957-61. PubMed PMID: 11342417. Epub 2001/05/09. eng.

25. Rocha V, Labopin M, Frasson F, Arcese W, Schwerdtfeger R, Asano S, Ringden O, De Lima M, Sanz G, and Gluckman E. Results of unrelated cord blood versus unrelated bone marrow transplant in adults with acute leukemia. A matched pair analysis. *Blood*. 2002;100 (Suppl. 1):42a.

-
26. Rocha V, Labopin M, Sanz G, Arcese W, Schwerdtfeger R, Bosi A, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med.* 2004 Nov 25;351(22):2276-85. PubMed PMID: 15564544. Epub 2004/11/27. eng.
27. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang MJ, Champlin RE, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med.* 2004 Nov 25;351(22):2265-75. PubMed PMID: 15564543. Epub 2004/11/27. eng.
28. Mayani H, Lansdorp PM. Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. *Blood.* 1994 May 1;83(9):2410-7. PubMed PMID: 7513197. Epub 1994/05/01. eng.
29. Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Oct 11;91(21):9857-60. PubMed PMID: 7937905. Pubmed Central PMCID: 44916.
30. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med.* 1998 Nov 26;339(22):1565-77. PubMed PMID: 9828244. Epub 1998/11/26. eng.
31. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med.* 1997 Aug 7;337(6):373-81. PubMed PMID: 9241126. Epub 1997/08/07. eng.

-
32. Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, Stevens C, Kurtzberg J, Scaradavou A, et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet*. 2007 Jun 9;369(9577):1947-54. PubMed PMID: 17560447. Epub 2007/06/15. eng.
33. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood*. 2002 Sep 1;100(5):1611-8. PubMed PMID: 12176879. Epub 2002/08/15. eng.
34. Wagner JE, Rosenthal J, Sweetman R, Shu XO, Davies SM, Ramsay NK, et al. Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood*. 1996 Aug 1;88(3):795-802. PubMed PMID: 8704232. Epub 1996/08/01. eng.
35. Barker JN, Krepski TP, DeFor TE, Davies SM, Wagner JE, Weisdorf DJ. Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(5):257-60. PubMed PMID: 12064362. Epub 2002/06/18. eng.
36. Brunstein CG. Umbilical cord blood transplantation for the treatment of hematologic malignancies. *Cancer Control*. 2011 Oct;18(4):222-36. PubMed PMID: 21976241. Epub 2011/10/07. eng.
37. Sanz J, Montesinos P, Saavedra S, Lorenzo I, Senent L, Planelles D, et al. Single-unit umbilical cord blood transplantation from unrelated donors in adult patients with chronic myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow*

Transplant. 2010 Nov;16(11):1589-95. PubMed PMID: 20553927. Epub 2010/06/18. eng.

38. Sanz J, Sanz MA, Saavedra S, Lorenzo I, Montesinos P, Senent L, et al. Cord blood transplantation from unrelated donors in adults with high-risk acute myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010 Jan;16(1):86-94. PubMed PMID: 19744570. Epub 2009/09/12. eng.

39. Saavedra S, Sanz GF, Jarque I, Moscardo F, Jimenez C, Lorenzo I, et al. Early infections in adult patients undergoing unrelated donor cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002 Dec;30(12):937-43. PubMed PMID: 12476288. Epub 2002/12/12. eng.

40. Takahashi S, Ooi J, Tomonari A, Konuma T, Tsukada N, Oiwa-Monna M, et al. Comparative single-institute analysis of cord blood transplantation from unrelated donors with bone marrow or peripheral blood stem-cell transplants from related donors in adult patients with hematologic malignancies after myeloablative conditioning regimen. *Blood.* 2007 Feb 1;109(3):1322-30. PubMed PMID: 17038536. Epub 2006/10/14. eng.

41. Sanz MA. Cord-blood transplantation in patients with leukemia--a real alternative for adults. *N Engl J Med.* 2004 Nov 25;351(22):2328-30. PubMed PMID: 15564549. Epub 2004/11/27. eng.

42. Eapen M, Rocha V, Sanz G, Scaradavou A, Zhang MJ, Arcese W, et al. Effect of graft source on unrelated donor haemopoietic stem-cell transplantation in adults with acute leukaemia: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2010 Jul;11(7):653-60. PubMed PMID: 20558104. Pubmed Central PMCID: 3163510. Epub 2010/06/19. eng.

43. Barker JN, Weisdorf DJ, Wagner JE. Creation of a double chimera after the transplantation of umbilical-cord blood from two partially matched unrelated donors. *N Engl J Med*. 2001 Jun 14;344(24):1870-1. PubMed PMID: 11407361. Epub 2001/06/16. eng.
44. De Lima M, St John LS, Wieder ED, Lee MS, McMannis J, Karandish S, et al. Double-chimaerism after transplantation of two human leucocyte antigen mismatched, unrelated cord blood units. *Br J Haematol*. 2002 Dec;119(3):773-6. PubMed PMID: 12437658. Epub 2002/11/20. eng.
45. Lister J, Gryn JF, McQueen KL, Harris DT, Rossetti JM, Shadduck RK. Multiple unit HLA-unmatched sex-mismatched umbilical cord blood transplantation for advanced hematological malignancy. *Stem Cells Dev*. 2007 Feb;16(1):177-86. PubMed PMID: 17348813. Epub 2007/03/14. eng.
46. Rocha V, Gluckman E. Improving outcomes of cord blood transplantation: HLA matching, cell dose and other graft- and transplantation-related factors. *Br J Haematol*. 2009 Oct;147(2):262-74. PubMed PMID: 19796275. Epub 2009/10/03. eng.
47. Rocha V, Crotta A, Ruggeri A, Purtill D, Boudjedir K, Herr AL, et al. Double cord blood transplantation: extending the use of unrelated umbilical cord blood cells for patients with hematological diseases. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010 Jun;23(2):223-9. PubMed PMID: 20837334. Epub 2010/09/15. eng.
48. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, Miller JS, et al. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood*. 2005 Feb 1;105(3):1343-7. PubMed PMID: 15466923. Epub 2004/10/07. eng.

49. Ballen KK, Spitzer TR, Yeap BY, McAfee S, Dey BR, Attar E, et al. Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Jan;13(1):82-9. PubMed PMID: 17222756. Pubmed Central PMCID: 2947324. Epub 2007/01/16. eng.
50. Ruggeri A, Peffault de Latour R, Carmagnat M, Clave E, Douay C, Larghero J, et al. Outcomes, infections, and immune reconstitution after double cord blood transplantation in patients with high-risk hematological diseases. *Transpl Infect Dis*. 2011 Oct;13(5):456-65. PubMed PMID: 21466640. Epub 2011/04/07. eng.
51. Ruggeri A, de Latour RP, Rocha V, Larghero J, Robin M, Rodrigues CA, et al. Double cord blood transplantation in patients with high risk bone marrow failure syndromes. *Br J Haematol*. 2008 Nov;143(3):404-8. PubMed PMID: 18699847. Epub 2008/08/14. eng.
52. Bradstock K, Hertzberg M, Kerridge I, Svenilson J, George B, McGurgan M, et al. Single versus double unrelated umbilical cord blood units for allogeneic transplantation in adults with advanced haematological malignancies: a retrospective comparison of outcomes. *Intern Med J*. 2009 Nov;39(11):744-51. PubMed PMID: 19220530. Epub 2009/02/18. eng.
53. Verneris MR, Brunstein CG, Barker J, MacMillan ML, DeFor T, McKenna DH, et al. Relapse risk after umbilical cord blood transplantation: enhanced graft-versus-leukemia effect in recipients of 2 units. *Blood*. 2009 Nov 5;114(19):4293-9. PubMed PMID: 19706886. Pubmed Central PMCID: 2774557. Epub 2009/08/27. eng.
54. Frassoni F, Gualandi F, Podesta M, Raiola AM, Ibatizi A, Piaggio G, et al. Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a

phase I/II study. *Lancet Oncol.* 2008 Sep;9(9):831-9. PubMed PMID: 18693069. Epub 2008/08/12. eng.

55. Brunstein CG, Barker JN, Weisdorf DJ, Defor TE, McKenna D, Chong SY, et al. Intra-BM injection to enhance engraftment after myeloablative umbilical cord blood transplantation with two partially HLA-matched units. *Bone Marrow Transplant.* 2009 Jun;43(12):935-40. PubMed PMID: 19139736. Epub 2009/01/14. eng.

56. Fernandez MN. Improving the outcome of cord blood transplantation: use of mobilized HSC and other cells from third party donors. *Br J Haematol.* 2009 Oct;147(2):161-76. PubMed PMID: 19796265. Epub 2009/10/03. eng.

57. Fernandez MN, Regidor C, Cabrera R, Garcia-Marco JA, Fores R, Sanjuan I, et al. Unrelated umbilical cord blood transplants in adults: Early recovery of neutrophils by supportive co-transplantation of a low number of highly purified peripheral blood CD34+ cells from an HLA-haploidentical donor. *Exp Hematol.* 2003 Jun;31(6):535-44. PubMed PMID: 12829030. Epub 2003/06/28. eng.

58. Shpall EJ, Quinones R, Giller R, Zeng C, Baron AE, Jones RB, et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8(7):368-76. PubMed PMID: 12171483. Epub 2002/08/13. eng.

59. Sideri A, Neokleous N, De La Grange PB, Guerton B, Le Bousse Kerdilles MC, Uzan G, et al. An overview of the progress on double umbilical cord blood transplantation. *Haematologica.* 2011 Aug;96(8):1213-20. PubMed PMID: 21546497. Pubmed Central PMCID: 3148916. Epub 2011/05/07. eng.

60. Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*. 1956 Mar 10;177(4506):452-4. PubMed PMID: 13309336.
61. Offit K, Burns JP, Cunningham I, Jhanwar SC, Black P, Kernan NA, et al. Cytogenetic analysis of chimerism and leukemia relapse in chronic myelogenous leukemia patients after T cell-depleted bone marrow transplantation. *Blood*. 1990 Mar 15;75(6):1346-55. PubMed PMID: 2310831. Epub 1990/03/15. eng.
62. Sparkes RS. Cytogenetic analysis in human bone marrow transplantation. *Cancer Genet Cytogenet*. 1981 Dec;4(4):345-52. PubMed PMID: 7037167. Epub 1981/12/01. eng.
63. Schattenberg A, De Witte T, Salden M, Vet J, Van Dijk B, Smeets D, et al. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation with lymphocyte-depleted bone marrow is not associated with a higher incidence of relapse. *Blood*. 1989 Apr;73(5):1367-72. PubMed PMID: 2564791. Epub 1989/04/01. eng.
64. Schaap N, Schattenberg A, Bar B, Mensink E, de Man A, Geurts van Kessel A, et al. Red blood cell phenotyping is a sensitive technique for monitoring chronic myeloid leukaemia patients after T-cell-depleted bone marrow transplantation and after donor leucocyte infusion. *Br J Haematol*. 2000 Jan;108(1):116-25. PubMed PMID: 10651734. Epub 2000/01/29. eng.
65. Casarino L, Carbone C, Capucci MA, Izzi T, Ferrara GB. Analysis of chimerism after bone marrow transplantation using specific oligonucleotide probes. *Bone Marrow Transplant*. 1992 Aug;10(2):165-70. PubMed PMID: 1356057. Epub 1992/08/01. eng.

66. Knowlton RG, Brown VA, Braman JC, Barker D, Schumm JW, Murray C, et al. Use of highly polymorphic DNA probes for genotypic analysis following bone marrow transplantation. *Blood*. 1986 Aug;68(2):378-85. PubMed PMID: 3524708. Epub 1986/08/01. eng.
67. Kogler G, Wolf HH, Heyll A, Arkesteijn G, Wernet P. Detection of mixed chimerism and leukemic relapse after allogeneic bone marrow transplantation in subpopulations of leucocytes by fluorescent in situ hybridization in combination with the simultaneous immunophenotypic analysis of interphase cells. *Bone Marrow Transplant*. 1995 Jan;15(1):41-8. PubMed PMID: 7742754. Epub 1995/01/01. eng.
68. Petz LD, Yam P, Wallace RB, Stock AD, de Lange G, Knowlton RG, et al. Mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *Blood*. 1987 Nov;70(5):1331-7. PubMed PMID: 3311201. Epub 1987/11/01. eng.
69. Bielora B, Trakhtenbrot L, Amariglio N, Rothman R, Tabori U, Dallal I, et al. Multilineage hematopoietic engraftment after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation without conditioning in SCID patients. *Bone Marrow Transplant*. 2004 Aug;34(4):317-20. PubMed PMID: 15220954. Epub 2004/06/29. eng.
70. Thiele J, Wickenhauser C, Kvasnicka HM, Varus E, Schneider C, Muller H, et al. Mixed chimerism of erythro- and megakaryopoiesis following allogeneic bone marrow transplantation. *Acta Haematol*. 2003;109(4):176-83. PubMed PMID: 12853689. Epub 2003/07/11. eng.
71. Thiele J, Wickenhauser C, Kvasnicka HM, Varus E, Beelen DW, Schaefer UW. Dynamics of lineage-restricted mixed chimerism following sex-

mismatched allogeneic bone marrow transplantation. *Histol Histopathol.* 2003 Apr;18(2):557-74. PubMed PMID: 12647807. Epub 2003/03/22. eng.

72. Seong CM, Giral S, Kantarjian H, Xu J, Swankowski J, Hayes K, et al. Early detection of relapse by hypermetaphase fluorescence in situ hybridization after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2000 May;18(9):1831-6. PubMed PMID: 10784623. Epub 2000/04/28. eng.

73. Lawler M, Humphries P, McCann SR. Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction. *Blood.* 1991 Jun 1;77(11):2504-14. PubMed PMID: 2039832. Epub 1991/06/01. eng.

74. Suttorp M, Schmitz N, Dreger P, Schaub J, Loffler H. Monitoring of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation with unmanipulated marrow by use of DNA polymorphisms. *Leukemia.* 1993 May;7(5):679-87. PubMed PMID: 8097800. Epub 1993/05/01. eng.

75. Bertheas MF, Lafage M, Blaise D, Stoppa AM, Viens P, Mannoni P, et al. Mixed chimerism after allogeneic bone marrow transplantation for leukemias. *Bone Marrow Transplant.* 1990 Jul;6 Suppl 1:61-3. PubMed PMID: 2390641. Epub 1990/07/01. eng.

76. Scharf SJ, Smith AG, Hansen JA, McFarland C, Erlich HA. Quantitative determination of bone marrow transplant engraftment using fluorescent polymerase chain reaction primers for human identity markers. *Blood.* 1995 Apr 1;85(7):1954-63. PubMed PMID: 7703498. Epub 1995/04/01. eng.

77. Oberkircher AR, Strout MP, Herzig GP, Fritz PD, Caligiuri MA. Description of an efficient and highly informative method for the evaluation of

hematopoietic chimerism following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1995 Nov;16(5):695-702. PubMed PMID: 8547867. Epub 1995/11/01. eng.

78. Kreyenberg H, Holle W, Mohrle S, Niethammer D, Bader P. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Tuebingen experience. *Leukemia.* 2003 Jan;17(1):237-40. PubMed PMID: 12529686. Epub 2003/01/17. eng.

79. Hancock JP, Goulden NJ, Oakhill A, Steward CG. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation using immunomagnetic selection and fluorescent microsatellite PCR. *Leukemia.* 2003 Jan;17(1):247-51. PubMed PMID: 12529688. Epub 2003/01/17. eng.

80. Acquaviva C, Duval M, Mirebeau D, Bertin R, Cave H. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Paris-Robert Debre experience. *Leukemia.* 2003 Jan;17(1):241-6. PubMed PMID: 12529687. Epub 2003/01/17. eng.

81. Chalandon Y, Vischer S, Helg C, Chapuis B, Roosnek E. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Geneva experience. *Leukemia.* 2003 Jan;17(1):228-31. PubMed PMID: 12529684. Epub 2003/01/17. eng.

82. Thiede C, Bornhauser M, Ehninger G. Strategies and clinical implications of chimerism diagnostics after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Acta Haematol.* 2004;112(1-2):16-23. PubMed PMID: 15179000. Epub 2004/06/05. eng.

83. Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood*. 2002 Jun 15;99(12):4618-25. PubMed PMID: 12036896. Epub 2002/05/31. eng.
84. Maas F, Schaap N, Kolen S, Zoetbrood A, Buno I, Dolstra H, et al. Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR of single nucleotide polymorphisms. *Leukemia*. 2003 Mar;17(3):621-9. PubMed PMID: 12646953. Epub 2003/03/21. eng.
85. Fredriksson M, Barbany G, Liljedahl U, Hermanson M, Kataja M, Syvanen AC. Assessing hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation by multiplexed SNP genotyping using microarrays and quantitative analysis of SNP alleles. *Leukemia*. 2004 Feb;18(2):255-66. PubMed PMID: 14671647. Epub 2003/12/13. eng.
86. Socie G, Lawler M, Gluckman E, McCann SR, Brison O. Studies on hemopoietic chimerism following allogeneic bone marrow transplantation in the molecular biology era. *Leuk Res*. 1995 Aug;19(8):497-504. PubMed PMID: 7658696. Epub 1995/08/01. eng.
87. Gyger M, Baron C, Forest L, Lussier P, Lagace F, Bissonnette I, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation has predictive value for the occurrence of irreversible graft failure and graft-vs.-host disease. *Exp Hematol*. 1998 May;26(5):426-34. PubMed PMID: 9590660. Epub 1998/05/20. eng.
88. Keil F, Prinz E, Moser K, Mannhalter C, Kalhs P, Worel N, et al. Rapid establishment of long-term culture-initiating cells of donor origin after nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation, and significant prognostic impact of donor T-cell chimerism on stable engraftment

and progression-free survival. *Transplantation*. 2003 Jul 15;76(1):230-6.

PubMed PMID: 12865815. Epub 2003/07/17. eng.

89. Childs R, Clave E, Contentin N, Jayasekera D, Hensel N, Leitman S, et al. Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood*. 1999 Nov 1;94(9):3234-41. PubMed PMID: 10556212. Epub 1999/11/11. eng.

90. Nesci S, Manna M, Andreani M, Fattorini P, Graziosi G, Lucarelli G. Mixed chimerism in thalassemic patients after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1992 Aug;10(2):143-6. PubMed PMID: 1525603. Epub 1992/08/01. eng.

91. Li CK, Chik KW, Tsang KS, Pong H, Shing MM, Yuen PM. Mixed chimerism after bone marrow transplantation for thalassemia major. *Haematologica*. 2002 Jul;87(7):781-2. PubMed PMID: 12091135. Epub 2002/07/02. eng.

92. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Migliaccio G, Migliaccio AR, et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Oct 24;92(22):10119-22. PubMed PMID: 7479737. Pubmed Central PMCID: 40747. Epub 1995/10/24. eng.

93. Sanz GF, Saavedra S, Jimenez C, Senent L, Cervera J, Planelles D, et al. Unrelated donor cord blood transplantation in adults with chronic myelogenous leukemia: results in nine patients from a single institution. *Bone Marrow Transplant*. 2001 Apr;27(7):693-701. PubMed PMID: 11360108. Epub 2001/05/22. eng.

94. Montesinos P, Sanz J, Cantero S, Lorenzo I, Martin G, Saavedra S, et al. Incidence, risk factors, and outcome of cytomegalovirus infection and disease in patients receiving prophylaxis with oral valganciclovir or intravenous ganciclovir after umbilical cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Jun;15(6):730-40. PubMed PMID: 19450758. Epub 2009/05/20. eng.
95. Lion T. Summary: reports on quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection. *Leukemia*. 2003 Jan;17(1):252-4. PubMed PMID: 12529689. Epub 2003/01/17. eng.
96. Lion T. Detection of impending graft rejection and relapse by lineage-specific chimerism analysis. *Methods Mol Med*. 2007;134:197-216. PubMed PMID: 17666752. Epub 2007/08/02. eng.
97. McCann SR, Crampe M, Molloy K, Lawler M. Hemopoietic chimerism following stem cell transplantation. *Transfus Apher Sci*. 2005 Feb;32(1):55-61. PubMed PMID: 15737874. Epub 2005/03/02. eng.
98. Ortega M, Escudero T, Caballin MR, Olive T, Ortega JJ, Coll MD. Follow-up of chimerism in children with hematological diseases after allogeneic hematopoietic progenitor cell transplants. *Bone Marrow Transplant*. 1999 Jul;24(1):81-7. PubMed PMID: 10435740. Epub 1999/08/06. eng.
99. Lawler M, McCann SR, Marsh JC, Ljungman P, Hows J, Vandenberghe E, et al. Serial chimerism analyses indicate that mixed haemopoietic chimerism influences the probability of graft rejection and disease recurrence following allogeneic stem cell transplantation (SCT) for severe aplastic anaemia (SAA): indication for routine assessment of chimerism post SCT for SAA. *Br J Haematol*. 2009 Mar;144(6):933-45. PubMed PMID: 19183198. Epub 2009/02/03. eng.

-
100. Bader P, Holle W, Klingebiel T, Handgretinger R, Benda N, Schlegel PG, et al. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children. *Bone Marrow Transplant.* 1997 Apr;19(7):697-702. PubMed PMID: 9156247. Epub 1997/04/01. eng.
101. Bader P, Beck J, Schlegel PG, Handgretinger R, Niethammer D, Klingebiel T. Additional immunotherapy on the basis of increasing mixed hematopoietic chimerism after allogeneic BMT in children with acute leukemia: is there an option to prevent relapse? *Bone Marrow Transplant.* 1997 Jul;20(1):79-81. PubMed PMID: 9232263. Epub 1997/07/01. eng.
102. Ramirez M, Diaz MA, Garcia-Sanchez F, Velasco M, Casado F, Villa M, et al. Chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1996 Dec;18(6):1161-5. PubMed PMID: 8971389. Epub 1996/12/01. eng.
103. Bader P, Holle W, Klingebiel T, Handgretinger R, Niethammer D, Beck J. Quantitative assessment of mixed hematopoietic chimerism by polymerase chain reaction after allogeneic BMT. *Anticancer Res.* 1996 Jul-Aug;16(4A):1759-63. PubMed PMID: 8712697. Epub 1996/07/01. eng.
104. Thiede C, Lutterbeck K, Oelschlagel U, Kiehl M, Steudel C, Platzbecker U, et al. Detection of relapse by sequential monitoring of chimerism in circulating CD34+ cells. *Ann Hematol.* 2002;81 Suppl 2:S27-8. PubMed PMID: 12611065. Epub 2003/03/04. eng.
105. Yam PY, Petz LD, Knowlton RG, Wallace RB, Stock AD, de Lange G, et al. Use of DNA restriction fragment length polymorphisms to document marrow engraftment and mixed hematopoietic chimerism following bone marrow

transplantation. *Transplantation*. 1987 Mar;43(3):399-407. PubMed PMID: 2881382. Epub 1987/03/01. eng.

106. Brunet S, Casals T, Madoz P, Aventin A, Muniz E, Baiget M. [DNA polymorphisms as implant markers in allogeneic bone marrow transplantation. Preliminary evaluation]. *Med Clin (Barc)*. 1989 Dec 16;93(20):765-71. PubMed PMID: 2576089. Epub 1989/12/16. Los polimorfismos del DNA como marcadores de implante en el trasplante alogénico de médula ósea. Valoración preliminar. spa.

107. Fehse B, Chukhlovina A, Kuhlcke K, Marinetz O, Vorwig O, Renges H, et al. Real-time quantitative Y chromosome-specific PCR (QYCS-PCR) for monitoring hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res*. 2001 Jun;10(3):419-25. PubMed PMID: 11454317. Epub 2001/07/17. eng.

108. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 Feb 11;16(3):1215. PubMed PMID: 3344216. Pubmed Central PMCID: 334765. Epub 1988/02/11. eng.

109. Gooley TA, Leisenring W, Crowley J, Storer BE. Estimation of failure probabilities in the presence of competing risks: new representations of old estimators. *Statistics in medicine*. 1999 Mar 30;18(6):695-706. PubMed PMID: 10204198.

110. Fine JP GR. A proportional hazards model for subdistribution of a competing risk. *J Am Stat Assoc* 1999;94(94):13.

-
111. R. Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
112. Thiede C, Bornhauser M, Oelschlagel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, et al. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia*. 2001 Feb;15(2):293-302. PubMed PMID: 11236950. Epub 2001/03/10. eng.
113. Fernandez-Aviles F, Urbano-Ispizua A, Aymerich M, Colomer D, Rovira M, Martinez C, et al. Serial quantification of lymphoid and myeloid mixed chimerism using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers predicts graft rejection and relapse, respectively, after allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood. *Leukemia*. 2003 Mar;17(3):613-20. PubMed PMID: 12646952. Epub 2003/03/21. eng.
114. Hoelle W, Beck JF, Dueckers G, Kreyenberg H, Lang P, Gruhn B, et al. Clinical relevance of serial quantitative analysis of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation in children for severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*. 2004 Jan;33(2):219-23. PubMed PMID: 14647253. Epub 2003/12/03. eng.
115. Matthes-Martin S, Lion T, Haas OA, Frommlet F, Daxberger H, Konig M, et al. Lineage-specific chimaerism after stem cell transplantation in children following reduced intensity conditioning: potential predictive value of NK cell chimaerism for late graft rejection. *Leukemia*. 2003 Oct;17(10):1934-42. PubMed PMID: 14513041. Epub 2003/09/27. eng.
116. Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giralto S, Mackinnon S, Spitzer T, et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic

lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001;7(9):473-85. PubMed PMID: 11669214. Epub 2001/10/24. eng.

117. Baron F, Baker JE, Storb R, Gooley TA, Sandmaier BM, Maris MB, et al. Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood*. 2004 Oct 15;104(8):2254-62. PubMed PMID: 15226174. Epub 2004/07/01. eng.

118. Baron F, Sandmaier BM. Chimerism and outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Leukemia*. 2006 Oct;20(10):1690-700. PubMed PMID: 16871276. Epub 2006/07/28. eng.

119. Kristt D, Stein J, Yaniv I, Klein T. Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility. *Bone Marrow Transplant*. 2007 Mar;39(5):255-68. PubMed PMID: 17262064. Epub 2007/01/31. eng.

120. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*. 1992 May;39(5):225-35. PubMed PMID: 1357775.

121. Buyse I, Decorte R, Baens M, Cuppens H, Semana G, Emonds MP, et al. Rapid DNA typing of class II HLA antigens using the polymerase chain

reaction and reverse dot blot hybridization. *Tissue Antigens*. 1993 Jan;41(1):1-14. PubMed PMID: 8456438.

122. Martin PJ, Schoch G, Fisher L, Byers V, Anasetti C, Appelbaum FR, et al. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood*. 1990 Oct 15;76(8):1464-72. PubMed PMID: 2207321.

123. Hill RS, Petersen FB, Storb R, Appelbaum FR, Doney K, Dahlberg S, et al. Mixed hematologic chimerism after allogeneic marrow transplantation for severe aplastic anemia is associated with a higher risk of graft rejection and a lessened incidence of acute graft-versus-host disease. *Blood*. 1986 Mar;67(3):811-6. PubMed PMID: 3511988. Epub 1986/03/01. eng.

124. Balon J, Halaburda K, Bieniaszewska M, Reichert M, Bieniaszewski L, Piekarska A, et al. Early complete donor hematopoietic chimerism in peripheral blood indicates the risk of extensive graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2005 Jun;35(11):1083-8. PubMed PMID: 15821766. Epub 2005/04/12. eng.

125. Moscardo F, Sanz GF, Sanz MA. Unrelated-donor cord blood transplantation for adult hematological malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2004 Jan;45(1):11-8. PubMed PMID: 15061192. Epub 2004/04/06. eng.

126. Moscardo F, Sanz J, Senent L, Cantero S, de la Rubia J, Montesinos P, et al. Impact of hematopoietic chimerism at day +14 on engraftment after unrelated donor umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancies. *Haematologica*. 2009 Jun;94(6):827-32. PubMed PMID: 19483157. Pubmed Central PMCID: 2688574. Epub 2009/06/02. eng.

127. Ho VT, Soiffer RJ. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2001 Dec 1;98(12):3192-204. PubMed PMID: 11719354.
128. Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DW, et al. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood*. 1991 Oct 15;78(8):2120-30. PubMed PMID: 1912589.
129. O'Reilly RJ. T-cell depletion and allogeneic bone marrow transplantation. *Semin Hematol*. 1992 Apr;29(2 Suppl 1):20-6. PubMed PMID: 1615341.
130. Hale G, Waldmann H. Control of graft-versus-host disease and graft rejection by T cell depletion of donor and recipient with Campath-1 antibodies. Results of matched sibling transplants for malignant diseases. *Bone Marrow Transplant*. 1994 May;13(5):597-611. PubMed PMID: 8054913.
131. Hale G, Waldmann H. Use of Ceprate CD34-positive selection system for depletion of T cells in allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1997 Oct;20(8):709-10. PubMed PMID: 9383240.
132. Urbano-Ispizua A, Rozman C, Pimentel P, Solano C, de la Rubia J, Brunet S, et al. The number of donor CD3(+) cells is the most important factor for graft failure after allogeneic transplantation of CD34(+) selected cells from peripheral blood from HLA-identical siblings. *Blood*. 2001 Jan 15;97(2):383-7. PubMed PMID: 11154212.
133. Nakamura R, Bahceci E, Read EJ, Leitman SF, Carter CS, Childs R, et al. Transplant dose of CD34(+) and CD3(+) cells predicts outcome in patients with haematological malignancies undergoing T cell-depleted peripheral blood stem cell transplants with delayed donor lymphocyte add-back. *Br J Haematol*. 2001 Oct;115(1):95-104. PubMed PMID: 11722418.

134. Aversa F, Tabilio A, Velardi A, Martelli MF. Allogeneic transplantation across the HLA barriers. *Rev Clin Exp Hematol*. 2001 Jun;5(2):147-61. PubMed PMID: 11486653.

135. Locatelli F, Rocha V, Chastang C, Arcese W, Michel G, Abecasis M, et al. Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. Eurocord-Cord Blood Transplant Group. *Blood*. 1999 Jun 1;93(11):3662-71. PubMed PMID: 10339472. Epub 1999/05/26. eng.

136. Ohnuma K, Isoyama K, Ikuta K, Toyoda Y, Nakamura J, Nakajima F, et al. Cord blood transplantation from HLA-mismatched unrelated donors as a treatment for children with haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2001 Mar;112(4):981-7. PubMed PMID: 11298596. Epub 2001/04/12. eng.

137. Migliaccio AR, Adamson JW, Stevens CE, Dobrila NL, Carrier CM, Rubinstein P. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood*. 2000 Oct 15;96(8):2717-22. PubMed PMID: 11023503. Epub 2000/10/07. eng.

138. Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W, Dueckers G, Kremens B, Dilloo D, et al. Increasing mixed chimerism defines a high-risk group of childhood acute myelogenous leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation where pre-emptive immunotherapy may be effective. *Bone Marrow Transplant*. 2004 Apr;33(8):815-21. PubMed PMID: 14990984. Epub 2004/03/03. eng.