



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA

Estudio de la Eficacia y Seguridad del Lavado de Progenitores
Hematopoyéticos de Sangre Periférica Criopreservados mediante un
Sistema Cerrado y Automatizado,
para Trasplantes Autólogos

D. Andrés Sánchez Salinas
2013

A "Fefi"

AGRADECIMIENTOS

Expresar mi inmenso agradecimiento a todas esas personas que a lo largo de mi vida han formado parte de ella, me han enseñado, querido y amado. Gracias a ellas, estoy donde estoy y he alcanzado el sueño de un niño.

Todas ellas han sido el apoyo necesario para que, pasito a pasito, pudiese escalar la montaña de mi vida, tanto en lo personal como en lo profesional.

En primer lugar agradecer al **Dr. José María Moraleda Jiménez**, Jefe del Servicio de Hematología y Terapia celular del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA), por confiar en mí desde un principio y abrir la puerta para la andadura como hematólogo en mi tierra; y enseñarme lo que hasta ahora sé, de este mundo lleno de incógnitas que es el trasplante de progenitores hematopoyéticos.

A las **Dras. María Juliana Majado y Consuelo Funes**, por aceptar la codirección en este trabajo. Sin su ayuda inestimable hoy no estaría escribiendo estas líneas.

Al **Dr. Miguel Blanquer Blanquer**, por formar parte de este camino que ha guiado mis pasos.

A **Paqui Iniesta**, por un reencuentro inesperado, por su infatigable trabajo y sobre todo por su enorme corazón.

A **todos los compañeros del Servicio de Hematología y Oncología Infantil del HCUVA**, en el sentido más amplio de la palabra (facultativos, enfermería, auxiliares, técnicos de laboratorio, data manager y personal administrativo), quienes con su aceptación y acogida han contribuido a encontrarme una vez más en familia.

A **Vicky y Pilar**, porque sin su trabajo diario esta obra no podría haberse puesto en marcha.

A **todas esas personas que, durante mi estancia en Madrid**, colaboraron en mi formación básica como hematólogo, a la vez que nos cuidaron y nos hicieron un hueco en sus vidas.

A **mis padres, hermanos y abuela** por darme todo el amor del mundo.

Por **todos aquellos que ahora no están entre nosotros** pero, que igualmente han contribuido en la andadura de mi vida.

Finalmente a **PATRI**, el regalo más grande que Dios me ha dado, por ser mi apoyo en los buenos momentos pero también en los malos, por aceptarme con mis defectos y enseñarme otras perspectivas de la vida, y como no, por ese otro regalo del cielo que lleva consigo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	10
FIGURAS, TABLAS y GRÁFICOS	14
INTRODUCCIÓN	20
I. Progenitores hematopoyéticos.	21
I.1- Hematopoyesis.	21
I.1.1- Regulación de la hematopoyesis.	21
I.1.2- Fenotipo y cuantificación de los progenitores hematopoyéticos.	26
I.1.2.1- Recuentos celulares.	26
I.1.2.2- Fenotipo de los progenitores hematopoyéticos.	27
I.1.2.3- Cultivos celulares.	31
I.1.2.4- Ensayos de repoblación <i>in vivo</i>.	33
I.2- El trasplante de progenitores hematopoyéticos.	34
I.2.1- Historia.	34
I.2.2- Objetivos e indicaciones.	39
I.2.3- Tipos.	39
I.2.3.1- Según el tipo de donante.	39
I.2.3.2- Según la procedencia de los progenitores hematopoyéticos.	40
I.2.4- Etapas del trasplante de progenitores hematopoyéticos.	41
I.2.5- Fuentes de progenitores hematopoyéticos.	46
I.2.6- Movilización de progenitores hematopoyéticos.	48
I.2.7- Recolección celular.	50
II. Criobiología y progenitores hematopoyéticos.	51
II.1- La membrana citoplasmática.	51
II.1.1- Estructura de la membrana citoplasmática.	51
II.1.2- Composición de la membrana citoplasmática.	53

II.1.3- Empaquetamiento de los lípidos de membrana.	54
II.2- Respuesta celular a las bajas temperaturas.	55
II.2.1- Conceptos generales.	55
II.2.2- Difusión y ósmosis.	57
II.2.3- Osmolaridad.	58
II.3- Criopreservación celular.	59
II.3.1- Conceptos generales.	59
II.3.1.1- Congelación.	59
II.3.1.2- Descongelación.	60
II.3.2- Lesiones crioinducidas.	62
II.3.2.1- Formación de hielo.	62
II.3.2.1.1- Hielo extracelular.	63
II.3.2.1.2- Hielo intracelular.	63
II.3.2.2- Estrés osmótico.	66
II.3.2.3- Parámetros biofísicos.	67
II.3.3- Concentración celular durante la congelación de progenitores hematopoyéticos.	68
II.3.4- Crioprotectores.	69
II.3.4.1- Dimetilsulfóxido.	70
II.3.4.2- Cambios celulares debidos al dimetilsulfóxido tras la descongelación.	73
II.3.4.3- Toxicidad del dimetilsulfóxido.	74
II.3.4.3.1- Toxicidad química celular.	74
II.3.4.3.2- Toxicidad asociada a la infusión.	75
II.3.5- Respuesta osmótica de los progenitores hematopoyéticos al lavado post-descongelación.	77

HIPÓTESIS y OBJETIVOS	79
MATERIAL y MÉTODOS	82
I. Pacientes.	83
II. Movilización.	84
III. Recolección celular.	84
IV. Caracterización, procesamiento, criopreservación y conservación celular.	86
IV.1- Recuentos celulares.	87
IV.2- Cultivos de unidades formadoras de colonias granulomacrofágicas.	89
IV.3- Viabilidad celular.	89
IV.4- Citometría de flujo.	90
IV.5- Cultivos bacteriológicos.	91
V. Acondicionamiento.	91
VI. Infusión celular.	93
VII. Sistema automático de lavado de dimetilsulfóxido en productos hematopoyéticos descongelados.	94
VII.1- Sepax [®] S-100.	94
VII.2- Equipo desechable (Kit CS-600.1 para Sepax [®]).	95
VII.3- Protocolo de lavado.	95
VIII. Manejo clínico del paciente y criterio transfusional.	98
IX. Metodología estadística.	99
IX.1- Variables clínicas: demográficas y de la enfermedad.	99
IX.2- Variables del inóculo.	100
IX.3- Variables del injerto hematopoyético.	101
IX.4- Análisis estadístico.	101
RESULTADOS	103
I. Estudio de la homogeneidad de los dos grupos de trasplantes, con y sin depleción de dimetilsulfóxido.	104
I.1- Estudio de la homogeneidad de las características de los pacientes en los dos grupos.	104
I.2- Estudio comparativo de las características de los productos celulares, tras la descongelación, entre los grupos de trasplante de progenitores hematopoyéticos con y sin depleción de dimetilsulfóxido.	110

II. Estudio de los efectos del procedimiento de lavado para la depleción de dimetilsulfóxido sobre los progenitores hematopoyéticos.	111
II.1- Estudio de la eficacia del procedimiento de lavado celular para la depleción de dimetilsulfóxido.	112
II.2- Estudio de la seguridad del procedimiento de lavado para depleción de dimetilsulfóxido.	114
III. Comparación de la seguridad y eficacia del trasplante de progenitores hematopoyéticos entre el grupo control y el grupo experimental.	115
III.1- Características del inóculo celular.	116
III.1.1- Composición celular del inóculo.	116
III.1.2- Unidades formadoras de colonias granulomacrofágicas, eritroides y megacariocíticas.	116
III.2- Estudio de la seguridad del procedimiento de infusión del inóculo en el trasplante de progenitores hematopoyéticos.	117
III.2.1- Reacciones adversas durante la infusión de progenitores hematopoyéticos.	117
III.2.2- Contaminación bacteriana.	119
III.2.3- Tiempos de injerto leucocitario y plaquetar.	121
III.2.4- Requerimientos transfusionales.	126
III.3- Días de fiebre y hospitalización.	127
DISCUSIÓN	132
CONCLUSIONES	155
BIBLIOGRAFÍA	157
APORTACIONES	179

ABREVIATURAS

7-AAD	7-aminoactinomicina.
ACP	Agentes crioprotectores.
ADQT	Altas dosis de quimioterapia.
AIR	Acondicionamiento de intensidad reducida.
AR	Alto riesgo.
ATG	Globulina antitimocítica.
ATP	Adenosíntrifosfato.
BEAC	Carmustina, etopósido, citarabina y ciclofosfamida.
BEAM	Carmustina, etopósido, citarabina y melfalán.
BFU-E	Unidad formadora de explosiones de colonias o <i>Burst forming unit</i> eritroide.
BFU-Meg	Unidad formadora de explosiones de colonias o <i>Burst forming unit</i> megacariocítica.
CAFC	Células formadoras de áreas de empedrado o <i>cobblestone area forming cells</i> .
CBV	Ciclofosfamida, carmustina y etopósido.
CMF	Citometría de flujo.
CMN	Células mononucleadas.
CMV	Citomegalovirus.
CN	Células nucleadas.
CT	Células totales.
CXCL12 o SDF-1	Factor estimulante de la colonias de células pre-B.
CXCR4	Receptor de la citoquina tipo 4 o fusina.
DMS	Sulfuro de dimetilo.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
EAI	Enfermedades autoinmunes.
EBMT	Grupo Europeo de Trasplante de médula ósea.
EBV	Virus Ebstein-Barr.
EG	Etilen-glicol.
EICH	Enfermedad injerto contra huésped.
EMR	Enfermedad mínima residual.
FLT-3	<i>Fms-like tyrosine kinase 3</i> .
FSC	<i>Forward Scatter</i> o dispersión frontal.
GETH	Grupo Español de Trasplante Hematopoyético.

G-CSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas.
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas y monocíticas.
HEPA	<i>High Efficiency Particulate Air</i> o alta eficiencia de partículas de aire.
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> o Antígeno leucocitario humano.
ICAM-1	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule</i> o molécula de adhesión inter-celular 1.
ICAM-3	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule</i> o molécula de adhesión inter-celular 3.
ICT	Irradiación corporal total.
IP	Ioduro de propidio.
IPI	Índice pronóstico internacional.
ISHAGE	<i>International Society for Hematotherapy and Graft Engineering</i> .
LAL	Leucemia aguda linfoblástica.
LAM	Leucemia aguda mieloide.
LH	Linfoma de Hodgkin.
LMC	Leucemia mieloide crónica.
LMMJ	Leucemia mielomonocítica juvenil.
LNH	Linfoma no Hodgkin.
LTCIC	Células iniciadoras de cultivos a largo plazo o <i>long term culture initiating cells</i> .
MAPC	Células Progenitoras Multipotenciales del Adulto.
MIP-1α	Proteína inflamatoria del macrófago.
MO	Médula ósea.
NaCl	Cloruro sódico.
PECAM-1	<i>Platelet/Endothelial Cellular Adhesion Molecule</i> o molécula de adhesión celular plaquetario/endotelial 1.
PEG	Polietilen-glicol.
PH	Progenitores hematopoyéticos.
PHSP	Progenitores hematopoyéticos de sangre periférica.
PNET	Tumor neuroectodérmico primitivo.
PROH	1,2-Propanodiol.
PVP	Polivinil-pirrolidona.
SCU	Sangre de cordón umbilical.

SMD	Síndrome mielodisplásico.
SNC	Sistema nervioso central.
SP	Sangre periférica.
SSC	<i>Side Scatter</i> o dispersión lateral.
TASPE	Trasplante autólogo progenitores hematopoyéticos de sangre periférica.
TAPH	Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos.
TGF-β	Factor transformador del crecimiento beta.
Tm	Temperatura Melting.
TMO	Trasplante médula ósea.
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor</i> o Factor de necrosis tumoral alfa.
TPH	Trasplante progenitores hematopoyéticos.
UFC-C	Unidad formadora de colonias en cultivo.
UFC-E	Unidad formadora de colonias eritroides.
UFC-G	Unidad formadora de colonias granulocíticas.
UFC-GEMM	Unidad formadora de colonias granulo-eritro-macrofago-megacariocíticas.
UFC-GM	Unidad formadora de colonias granulomacrofágicas.
UFC-L	Unidad formadora de colonias linfoides.
UFC-LM	Unidad formadora de colonias linfomieloides.
UFC-M	Unidad formadora de colonias macrofágicas.
UFC-Meg	Unidad formadora de colonias megacariocíticas.
UHC	Unidades de hematíes concentrados.
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i> o molécula de adhesión células vasculares 1.
VLA-4	<i>Very Late Antigen 4</i> .

FIGURAS, TABLAS y GRÁFICOS

Fig. 1	Localización de la hematopoyesis en el ser humano.	23
Fig. 2	Esquema de la hematopoyesis y lugares de actuación de los factores de crecimiento más importantes.	25
Fig. 3.1	Colonia granulomacrofágica de médula ósea.	32
Fig. 3.2	Colonia eritroide derivada de una BFU-E.	33
Fig. 3.3	Colonia megacariocítica.	33
Fig. 4	Trasplantes de Progenitores Hematopoyéticos autólogos. España. 1993-2010.	38
Fig. 5.1	Esquema del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.	42
Fig. 5.2	Esquema del trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos.	42
Fig. 6	Esquema de la membrana plasmática según el modelo de mosaico fluido de Singer y Nicholson.	52
Fig. 7.1	Posición de los fosfolípidos y el colesterol en las membranas plasmáticas.	54
Fig. 7.2	Influencia de los dobles enlaces en el empaquetamiento de membrana.	55
Fig. 8	Tipos de transporte: activo y pasivo.	57
Fig. 9.1	Adición del crioprotector y equilibrio entre el exterior y el interior celular.	61
Fig. 9.2	Sobreenfriamiento de la suspensión celular.	61
Fig. 9.3	Nucleación, formación de hielo y aumento de la osmolaridad extracelular.	61
Fig. 9.4	Deshidratación celular en respuesta a la congelación.	61
Fig. 10.1	Descongelación y disminución de la osmolaridad extracelular.	61
Fig. 10.2	Entrada de agua a la célula en el proceso de descongelación.	61
Fig. 11	Efecto de la velocidad de congelación en la formación de hielo intracelular.	65
Fig. 12	Naturaleza de los daños criointducidos según la velocidad de congelación.	65
Fig. 13	Variación de volumen de las células CD34+ de SCU en presencia de 10% v/v de DMSO a 22°C.	70
Fig. 14	Congelador biológico que permite la criopreservación de muestras de forma programada.	72
Fig. 15	Tanque de nitrógeno líquido, que mantiene -196°C en la fase líquida y entre -140°C y -196°C en la fase de gas para la conservación de los progenitores hematopoyéticos.	72
Fig. 16	Fórmula volumen sanguíneo.	85

Fig. 17	Procesador celular CS-3000 plus [®] .	86
Fig. 18	Procesador celular Cobe [®] Spectra.	86
Fig. 19	Fórmula para el cálculo del volumen final.	87
Fig. 20	Contador celular automático Sysmex [®] KX-21N.	88
Fig. 21	Fórmula para el cálculo del número (nº) de colonias totales.	89
Fig. 22	Citómetro de flujo BD FACSCanto II [®] .	91
Fig. 23	Procesador celular Sepax [®] S-100.	95
Fig. 24	Equipo desechable del sistema Sepax [®] S-100.	96
Fig. 25	Esquema del protocolo de lavado Sepax [®] S-100.	97

Tabla 1	Indicaciones principales para la realización de TPH alogénico y/o autólogo.	40
Tabla 2	Acondicionamientos más utilizados en los trasplantes autólogos de progenitores hematopoyéticos.	93
Tabla 3	Dosis de busulfán intravenoso en pacientes pediátricos según peso del paciente.	93
Tabla 4	Características de los pacientes sometidos a TPH autólogo.	105
Tabla 5	Regímenes de acondicionamiento utilizados en los TPH autólogos con y sin depleción de DMSO.	108
Tabla 6	Distribución de edades (media $\pm$ desviación estándar en años) según los diagnósticos de los grupos a estudio.	109
Tabla 7	Valores de los recuentos celulares (CT , CD34+ , UFC-GM , BFU-E , UFC-Meg) por cada TASPE (media $\pm$ desviación estándar) en cada uno de los grupos a estudio tras la descongelación.	111
Tabla 8	Datos de los valores celulares y de la viabilidad en las bolsas descongeladas antes y después de los lavados (media $\pm$ desviación estándar).	113
Tabla 9	Recuperación post-lavado de los valores celulares y de la viabilidad respecto a los observados antes del procedimiento del lavado (media $\pm$ desviación estándar).	113
Tabla 10	Distribución de los gérmenes bacterianos identificados en los cultivos de control de las bolsas antes y después del proceso de lavado.	115
Tabla 11	Valores de los recuentos celulares (CT , CD34+ , UFC-GM , BFU-E , UFC-Meg) en el inóculo infundido por cada TASPE (media $\pm$ desviación estándar) en cada uno de los grupos a estudio.	117
Tabla 12	Distribución de los gérmenes bacterianos identificados en los cultivos de control.	120
Tabla 13	Parámetros estadísticos de injerto leucocitario, neutrofílico y plaquetar en cada uno de los grupos a estudio.	122
Tabla 14	Número de pacientes en los dos grupos del estudio, según el día de injerto leucocitario ($>0.5 \times 10^9/L$).	124
Tabla 15	Número de pacientes en los dos grupos del estudio, según el día de injerto de neutrófilos ($>0.5 \times 10^9/L$).	124

Tabla 16	Número de pacientes en los diferentes grupos del estudio, según el día de injerto de plaquetas ($>20 \times 10^9/L$).	126
Tabla 17	Número de pacientes en los diferentes grupos del estudio, según los intervalos de días de hospitalización tras TASPE.	128
Tabla 18	Número de pacientes en los diferentes grupos del estudio, según la duración de la fiebre (días) durante la hospitalización durante el TASPE.	129
Tabla 19	Relación de aislamientos microbiológicos en pacientes con episodios febriles sometidos a TPH.	130
Tabla 20	Resultados del uso de diferentes métodos de depleción de DMSO en trabajos revisados y en nuestro estudio.	152

Gráfico 1	Distribución de la población según rangos de edad.	106
Gráfico 2	Distribución de la población por diagnósticos.	106
Gráfico 3	Distribución de la población según número de líneas de tratamiento recibidas.	107
Gráfico 4	Distribución de la población según número de aféresis requeridas para obtener $2 \times 10^6/\text{Kg}$ peso del paciente de células CD34+.	108
Gráfico 5	Distribución de edades (media) por enfermedades.	109
Gráfico 6	Distribución de pacientes según el número de infusiones realizadas.	110
Gráfico 7	Contaminación bacteriana en las bolsas de PH en el grupo de TPH con depleción del DMSO antes y después de ser lavados.	114
Gráfico 8	Efectos adversos más frecuentes en grupo de TPH sin depleción de DMSO.	118
Gráfico 9	Número de pacientes con efectos adversos tras infusión de progenitores hematopoyéticos.	118
Gráfico 10	Contaminación bacteriana en las bolsas de PH en el grupo de TPH sin y en el grupo con depleción del DMSO después de ser lavados.	119
Gráfico 11	Intervalos de confianza 95% para la diferencia entre los grupos en cuanto al día de injerto leucocitario ($>0,5 \times 10^9/\text{L}$) y neutrófilico ($>0,5 \times 10^9/\text{L}$).	122
Gráfico 12	Día injerto Leucocitos ($>0.5 \times 10^9/\text{L}$).	123
Gráfico 13	Día injerto Neutrófilos ($>0.5 \times 10^9/\text{L}$).	123
Gráfico 14	Intervalos de confianza 95% para la diferencia entre los grupos en cuanto al día de injerto plaquetar ($>20 \times 10^9/\text{L}$).	125
Gráfico 15	Día injerto Plaquetario ($>20 \times 10^9/\text{L}$).	125
Gráfico 16	Distribución de la población según si precisaron de requerimientos transfusionales: A) Concentrados de hematíes. B) Pooles de plaquetas.	126
Gráfico 17	Distribución de los pacientes según: A) número de concentrados de hematíes recibidos. B) Pooles de plaquetas recibidos.	127
Gráfico 18	Distribución de la población según días de hospitalización.	127
Gráfico 19	Distribución de la incidencia de fiebre durante el TPH.	128
Gráfico 20	Distribución de la población según días de fiebre.	129

INTRODUCCIÓN

I- Progenitores hematopoyéticos.

I.1- Hematopoyesis.

La hematopoyesis es el proceso biológico que da lugar a la formación continuada de los distintos tipos de elementos formes sanguíneos (hematíes, leucocitos y plaquetas), manteniéndolos dentro de los límites de la normalidad en la sangre periférica. La hematopoyesis en el ser humano tiene diferentes localizaciones anatómicas a lo largo del desarrollo embrionario (fig.1). La producción de células sanguíneas comienza en el saco vitelino durante las primeras 2-3 semanas de gestación, posteriormente, las células hematopoyéticas se encuentran dentro del propio embrión en la región gonado-mesonefros^[2], desde donde las células madre hematopoyéticas migran entre el segundo y séptimo mes, al hígado, y en menor grado, al bazo, siendo éstos los lugares más importantes de producción; a partir del séptimo mes, la médula ósea (MO) se convierte en el órgano hematopoyético principal hasta el nacimiento; desde entonces es el único foco de hematopoyesis en condiciones normales. Esto indica que las células madre son capaces de emigrar. Durante los dos primeros años de vida, la médula ósea activa (médula roja) se localiza en todos los huesos y, gradualmente, es reemplazada por tejido medular inactivo (médula amarilla o grasa). Este proceso se inicia en las diáfisis de los huesos largos y, en los adultos jóvenes, la médula roja se localiza finalmente en las epífisis de los huesos largos, el esternón, las costillas, el cráneo, las vértebras y la pelvis. La expansión del tejido hematopoyético finaliza en la infancia^[3].

I.1.1- Regulación de la hematopoyesis.

La MO proporciona un microambiente óptimo para el anidamiento, la proliferación y la diferenciación de las células madre hematopoyéticas. El microambiente hematopoyético está constituido por un conjunto de células (endoteliales, reticulares adventiciales,

macrófagos, linfocitos, adipocitos y osteoblastos), factores solubles y otras proteínas de la matriz extracelular (fibronectina, colágeno, laminina, etc.) esenciales para el desarrollo normal de las células madre^[1;4-6] y para su cultivo in vitro. El tejido hematopoyético por medio de receptores de anclaje o moléculas de adhesión (Very Late Antigen 4 o VLA-4, Vascular Cell Adhesion Molecule 1 o VCAM-1, Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 o ICAM-1, Inter-Cellular Adhesion Molecule 3 o ICAM-3, Platelet/Endothelial Cellular Adhesion Molecule 1 o PECAM-1, etc.) se sitúa en nichos específicos formados por células del estroma, entre los sinusoides medulares. En un momento crítico de la secuencia madurativa, se produce el paso de las células hematopoyéticas diferenciadas desde los cordones medulares a la sangre periférica a través de la pared sinusoidal, que está constituida por el endotelio, la membrana basal y la capa adventicia, modulando esta última, la intensidad de paso de las células hematopoyéticas a la circulación^[1;7;8]. Otras moléculas de adhesión como el factor derivado de la célula estromal (SDF-1 o CXCL12), se expresa constitutivamente en el estroma medular y su receptor el CXCR4 se expresa con intensidad en las células progenitoras hematopoyéticas. Este eje CXCL12-CXCR4 es fundamental para el anclaje de las células progenitoras hematopoyéticas al nicho de la médula ósea. Recientemente se han identificado antagonistas del CXCR4, que inducen una rápida movilización de las células progenitoras hematopoyéticas^[9].

El otro elemento fundamental para el control biológico de la hematopoyesis es la compleja red de factores de crecimiento y citocinas que la regulan. En su mayoría son glicoproteínas producidas por células del microambiente hematopoyético y otros tejidos que ejercen una actividad endocrina o paracrina coordinada y secuencial que es prácticamente imposible de reproducir in vitro.

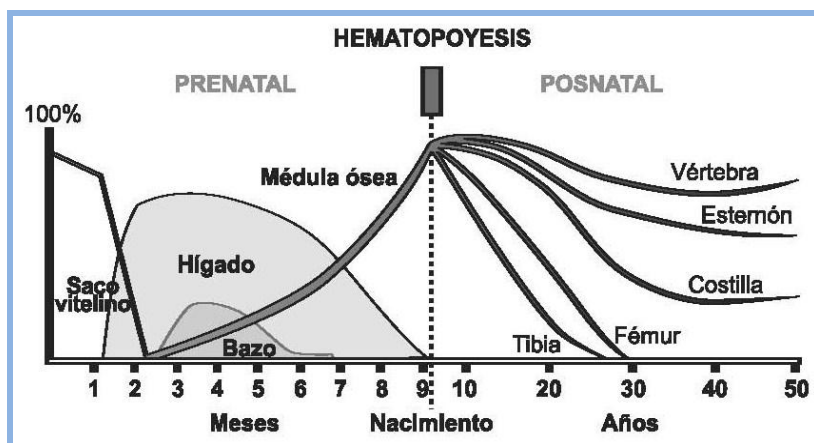


Fig.1. Localización de la hematopoyesis en el ser humano. (Tomado de Majado MJ y col.: "Hematopoyesis. Hematíes: estructura y función"; en Moraleda JM: Pregrado de Hematología, 2011, p 16).

Los factores de crecimiento son responsables de mantener la viabilidad y la supervivencia de las células progenitoras hematopoyéticas; su ausencia conduce a la muerte celular programada (apoptosis), mientras que su presencia preserva la viabilidad celular^[3]. En el mantenimiento de la hematopoyesis, además de los factores estimulantes, intervienen moléculas inhibitorias (proteína inflamatoria del macrófago o MIP-1 α , factor transformador del crecimiento beta o TGF- β , factor de necrosis tumoral alfa o TNF- α), que tienen un papel en el control de la producción celular normal y evitan fluctuaciones cíclicas del sistema^[3].

Hoy en día es posible disponer a escala experimental de casi todas estas sustancias o de potentes agonistas/antagonistas sintéticos de sus receptores. Algunas de estas sustancias están disponibles para su utilización farmacológica (eritropoyetina, factor estimulante de colonias granulocíticas o G-CSF, factor estimulante de colonias granulocíticas y monocíticas o GM-CSF, *stem cell factor*, trombopoyetina), mientras que otros se encuentran en distintas fases precomerciales de ensayo clínico (interleukina 11, Pixy 321, daniplestim, ligando de la Fms-like tyrosine kinase 3 o FLT-3, etc.)^[10].

La presencia de una célula troncal común circulante en sangre periférica ya fue intuita por A. Maximow en 1909^[11]. Este autor postuló que el linfocito actuaba como tal célula

troncal, y que migraba a través de los tejidos hasta asentarse en un microambiente adecuado. En la actualidad se distinguen tres grupos de células madre o células stem^[1]:

- la célula madre totipotencial, que es capaz de producir cualquier tipo celular, incluyendo los tejidos extraembrionarios,
- la célula madre pluripotencial, que tiene la capacidad de producir células de cualquiera de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Puede dar origen a cualquier célula fetal o adulta, pero no tiene el potencial para producir tejido extraembrionario, tal como la placenta, y
- la célula madre multipotencial tiene la capacidad de producir células específicas de una misma capa germinal (células sanguíneas, nerviosas, etc.). Se encuentran en los tejidos corporales y son las encargadas de reemplazar las células destruidas en los mismos. Todas las células sanguíneas provienen de una célula madre multipotencial, cuya característica principal, además de ser capaz de diferenciarse a todas las células sanguíneas, es su capacidad de autorrenovación.

Las células hematopoyéticas evolucionan a través de una sucesión de estadios madurativos bajo el influjo del microambiente medular (fig. 2).

Según el modelo de hematopoyesis actualmente admitido, podemos distinguir:

- Células progenitoras linfomieloides o UFC-LM: con capacidad de autorrenovación y diferenciación hacia la línea celular linfoide y mieloide. Son las verdaderas células madre o *stem*, y tienen capacidad de autorrenovación indefinida. Esta capacidad, cuyos mecanismos aún no han sido totalmente esclarecidos, está limitada probablemente en virtud del acortamiento telomérico^[12].

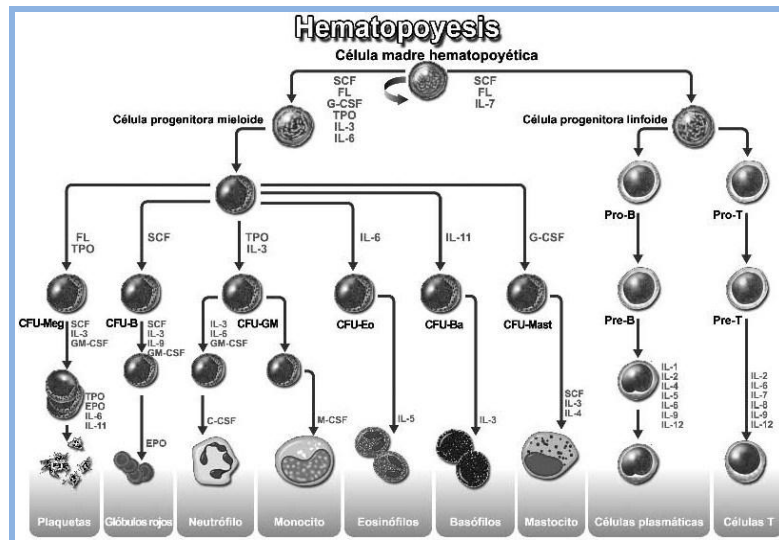


Fig. 2. Esquema de la hematopoyesis y lugares de actuación de los factores de crecimiento más importantes. (Tomado de Majado MJ y col.: "Hematopoyesis. Hematíes: estructura y función"; en Moraleda JM: Pregrado de Hematología, 2011, p 18).

- Células progenitoras con capacidad de diferenciación polivalente, pero sólo dentro de la línea mieloide (UFC-GEMM) o linfóide (UFC-L). Estas células tienen capacidad de autorrenovación limitada. Por todo lo anterior, utilizaremos el término progenitores hematopoyéticos (PH) de forma general, para hacer referencia al producto celular que se trasplanta, asumiendo que incluye un abanico de subpoblaciones celulares distintas.
- Células progenitoras comprometidas en su diferenciación a cada una de las líneas celulares específicas, eritroide (BFU-E), granulomacrofágica (UFC-GM) o megacariocítica (UFC-Meg).
- Células precursoras: que corresponden a las células morfológicamente reconocibles con microscopio óptico (mieloblastos, promonocitos, eritroblastos, megacariocitos, etc.).
- Células maduras: las cuales no tienen capacidad de división y son funcionalmente activas (leucocitos, hematíes y plaquetas).

I.1.2- Fenotipo y cuantificación de los progenitores hematopoyéticos.

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

I.1.2.1- Recuentos celulares.

Los recuentos de células totales (CT) y de células mononucleadas (CMN) constituyen la estimación más inmediata y sencilla del número de progenitores, pero con una correlación insuficiente de la cinética del injerto^[10]. Los PH no presentan características definidas que hagan posible distinguirlas de las poblaciones linfoides y monocitarias a través de contadores automáticos que no dispongan de un sistema de citometría con marcadores inmunológicos. Tanto el producto obtenido en una leucoaféresis de células mononucleadas como un aspirado de medula ósea contienen poblaciones celulares más heterogéneas y complejas que una sangre periférica normal. El recuento diferencial de estos productos que puede realizar un contador automático sanguíneo ha de ser interpretado con cautela y revisado al microscopio. Aunque el recuento manual ofrece pequeñas ventajas respecto al recuento automático, es también un estimador inadecuado de la calidad del producto. Los contadores que utilizan técnicas basadas en el tamaño celular para el recuento diferencial no son adecuados para determinar el porcentaje de CMN en un producto de aféresis^[10]. Los que utilizan tinciones de peroxidasa permiten diferenciar esta población con mayor precisión, al excluir de forma efectiva las poblaciones granulocíticas. No existe acuerdo acerca de la forma más adecuada de

cuantificar las CMN como estimador de calidad de un producto para trasplante. Las ventajas innegables de estos recuentos son su disponibilidad inmediata y su reproducibilidad. Además de ser un factor importante para el posterior estudio de citometría de flujo, estos recuentos son de utilidad para la toma de decisiones durante la recolección y en el procesamiento de los productos celulares. En el trasplante de PH (TPH) los recuentos de CT y de CMN han sido y siguen siendo en muchos centros el parámetro fundamental que guía la recolección de PH. No obstante, no pueden considerarse sino como un estimador indirecto y poco sensible y específico del número de células madre multipotenciales.

I.1.2.2- Fenotipo de los progenitores hematopoyéticos.

La citometría de flujo (CMF) es una técnica de análisis celular multiparamétrica que se basa en hacer pasar una suspensión de células alineadas y de una en una por delante de un haz láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Éstos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula. La CMF determina parámetros relacionados con características intrínsecas de la célula (tamaño, complejidad de núcleo y citoplasma) y parámetros relacionados con sus características antigénicas (inmunofenotipo)^[13].

Las señales producidas por la interacción de las células con el haz de luz son de dos tipos: las señales de dispersión y las de fluorescencia:

- Señales de dispersión: la dispersión resulta de la interacción de la luz con una partícula que produce un cambio de dirección (no de la longitud de onda) en todas las direcciones del espacio. Las características morfológicas que determinan la dispersión

de la luz son fundamentalmente el tamaño celular (FSC, *Forward Scatter*) y el material granular del interior de la célula, llamado complejidad (SSC, *Side Scatter*)^[13].

- Señales de fluorescencia: cuando un fluorocromo interacciona con la luz de excitación procedente del láser emite energía radiante. Debido a que parte de la energía se utiliza para la absorción, la luz emitida es de menor energía que la luz de excitación, es decir la longitud de onda emitida es mayor. La diferencia entre la longitud de onda de absorción y emisión se denomina Stokes shift. Los citómetros de flujo permiten detectar señales de fluorescencia procedentes de complejos antígeno/anticuerpo marcados con un fluorocromo y situados en una célula, siendo la cantidad de señal de fluorescencia emitida igual a la proporción de la cantidad de componentes fluorescentes de la partícula^[13].

Los PH presentan un tamaño reducido o intermedio y un citoplasma agranular, características que permiten definir la ventana citométrica adecuada para el estudio del fenotipo antigénico. Este se lleva a cabo mediante anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos celulares y marcados con fluorescencia. Es posible utilizar combinaciones de varios anticuerpos con marcajes de distintos colores, con objeto de estudiar simultáneamente la expresión de más de un antígeno en la misma célula.

La aplicación de la citometría de flujo con marcajes inmunológicos permite caracterizar de forma rápida y precisa poblaciones celulares. El antígeno CD34 es una glicofosfoproteína con dominios extracelulares e intracitoplasmáticos que se expresa en las células progenitoras hematopoyéticas desde el nivel de célula madre hasta el estadio de progenitor comprometido en que pierde la capacidad de formar colonias *in vitro*^[14]. Además de los PH, en el adulto se ha demostrado su expresión en las células del endotelio vascular y en algunas células gliales. Es posible encontrar el CD34 en las células neoplásicas en el 40% de las leucemias agudas mieloblásticas, el 70% de las

linfoblásticas B, el 5-20% de las linfoblásticas T, en algunos síndromes mielodisplásicos y mieloproliferativos crónicos y en tumores de la pared vascular^[14].

La cuantificación de células que expresan el antígeno CD34 (CD34+) permite estimar el número de PH de un producto celular para trasplante de forma rápida y específica^[15]. Tomando como base la población de células CD34+ es posible definir distintas subpoblaciones de acuerdo a la expresión de otros antígenos de diferenciación. La célula madre indiferenciada CD34+ no expresa, o lo hace mínimamente, marcadores precoces propios del compromiso hacia líneas de diferenciación, como el CD33 (línea mieloide), el CD7 (línea linfoide T), el CD10 (línea linfoide B), el CD71 (línea eritroide) o el CD41 (línea megacariocítica). Asimismo, expresa débilmente el CD90 (Thy-1) y no expresa el CD38 ni el HLA-DR (o lo hace muy débilmente)^[14]. En la década de los 90 se suscitó un enorme interés la descripción de una subpoblación de células madre que no expresan el CD34 (CD34-)^[16-19]; en este sentido, se ha propuesto que el CD34 podría ser un marcador de activación, y que su expresión podría ser reversible^[20;21].

Las células CD34+ que no expresan el CD33 (CD34+/33-) constituyen una subpoblación enriquecida en progenitores indiferenciados que contiene casi todas las células con capacidad de iniciar cultivos a largo plazo, característica de las células madre^[22-24]. Esta subpoblación incluye también células comprometidas, capaces de iniciar cultivos a corto plazo y, probablemente, responsables del injerto inmediato. Por todo ello, el recuento de células CD34+/33- es un estimador rápido, fiable y consistente del número de PH y por tanto de la calidad del producto celular trasplantado^[10].

El porcentaje de células CD34+ que no expresan el CD33 varía según el origen de la muestra (médula o aféresis de sangre periférica) y según el tipo de movilización empleada^[25;26]. En general, dentro de las células CD34+ predomina la población

CD34+/33-, especialmente en muestras de aféresis de sangre periférica de pacientes movilizados con G-CSF y sin quimioterapia^[25-29]. Algunos estudios encuentran resultados diferentes, con una menor proporción de células CD34+/33-^[30;31]. Parte de esta variabilidad de resultados puede deberse, además del origen de la muestra y la movilización, al hecho de que el antígeno CD33 se expresa de forma débil en estas células^[31] o a la fuerte dependencia de la estrategia de elección de las ventanas citométricas o de los umbrales de detección^[25;32].

Otra de las utilidades de la CMF es la del estudio de la viabilidad celular mediante el marcaje con yoduro de propidio (IP) o 7-aminoactinomicina (7-AAD); siendo una técnica más fiable cuando queremos estudiar viabilidad de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica (PHSP) tras su descongelación^[13]. Entre los inconvenientes más importantes que presenta la citometría de flujo están las dificultades para conseguir precisión y reproducibilidad^[33]. En este sentido, se han realizado notables esfuerzos para desarrollar técnicas que consigan hacer comparables los resultados de distintos laboratorios^[34-37]. Las técnicas basadas en la selección de células según el FSC y el SSC (Protocolo de Milán/Mulhouse o Protocolo Nórdico) han mostrado en estudios de intercomparación, su reproducibilidad y su valor clínico como predictores del injerto en TPH autólogos de sangre periférica^[37]. En la actualidad la mayoría de los autores defienden la utilización de técnicas de mayor complejidad, como el Protocolo del ISHAGE (*International Society for Hematotherapy and Graft Engineering*), que incluyen selecciones celulares basadas en el marcaje del antígeno panleucocitario CD45 o en tinciones de ácidos nucleicos o de viabilidad citométrica^[35;36].

I.1.2.3- Cultivos celulares.

Las técnicas basadas en los cultivos celulares se desarrollaron antes que las basadas en la citometría de flujo, y por tanto constituyeron la base biológica de la cuantificación de progenitores en los primeros años de desarrollo del TPH^[38]. Estas técnicas proporcionan información acerca de la capacidad clonogénica del producto sembrado, si bien en general esta información no es inmediata, sino que es preciso prolongar el cultivo durante semanas o incluso meses (cultivos a largo plazo). Un primer escalón lo constituyen los cultivos de progenitores formadores de colonias en medio semisólido. Estos ensayos consisten en sembrar una cantidad de producto celular sobre un medio semisólido (agar, metilcelulosa o coágulos de plasma) enriquecido con factores de crecimiento procedentes de diversas fuentes (suero humano, sobrenadante de sangre placentaria, suero bovino fetal, citoquinas recombinantes) y cuantificar el número de colonias de cada tipo (identificables por su morfología o mediante tinciones inmunológicas) que se generan tras un periodo de incubación cercano a las dos semanas^[10].

Estos cultivos reflejan la presencia de progenitores comprometidos hacia una o más líneas hematopoyéticas. Es posible detectar la presencia de unidades formadoras de colonias eritroides (UFC-E), macrofágicas (UFC-M), granulocíticas (UFC-G), megacariocíticas (UFC Meg), granulomacrofágicas (UFC-GM), o granulo-eritro-macrofago-megacariocítica (UFC-GEMM)^[16] (fig. 3.1-3.3). De todas ellas, las UFC-GM son las más utilizadas para estimar, en la práctica clínica, el número de progenitores^[38]. Las dosis de UFC-GM trasplantadas se correlacionan satisfactoriamente con la cinética de injerto, presentando una influencia significativa independiente de la dosis de células CD34⁺^[10]. Los inconvenientes fundamentales para

el uso rutinario de esta técnica son la ausencia de resultados inmediatos y los problemas de precisión y reproducibilidad entre distintos laboratorios que se plantean^[10;33;38;39].

Los progenitores más inmaduros, incluyendo las células madre indiferenciadas, son capaces de dar origen a cultivos celulares a largo plazo en presencia de estroma medular o de medio condicionado con estroma. Algunas técnicas aprovechan esta propiedad para detectar “células formadoras de áreas de empedrado” (CAFC o “*cobblestone area forming cells*”)^[40] o “células iniciadoras de cultivos a largo plazo” (LTCIC o “*long term culture initiating cells*”)^[41]. Estas técnicas estiman de forma mucho más específica la presencia de células madre.

Sin embargo, se tratan de métodos complejos, con varias fuentes de potencial imprecisión y variabilidad, y que tan solo deparan resultados a largo plazo (a partir de 5 semanas). Estas técnicas tienen un importante papel en investigación y en la validación de nuevos procedimientos, pero no en la estimación de la calidad de los productos celulares en la clínica.

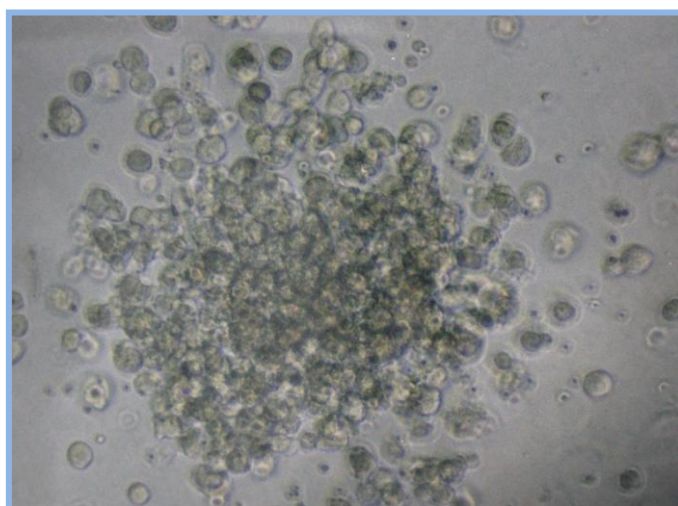


Fig. 3.1. Colonia granulomacrofágicas de médula ósea (x400).

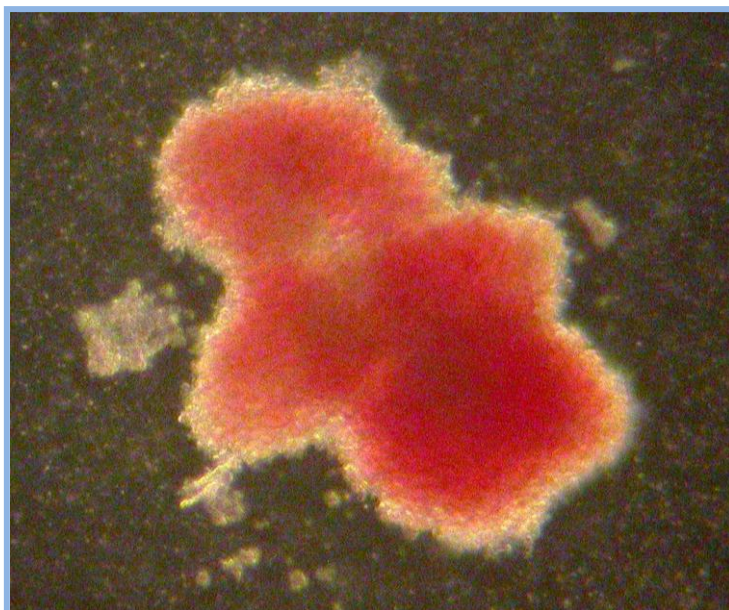


Fig. 3.2. Colonia eritroide derivada de una BFU-E (x400).

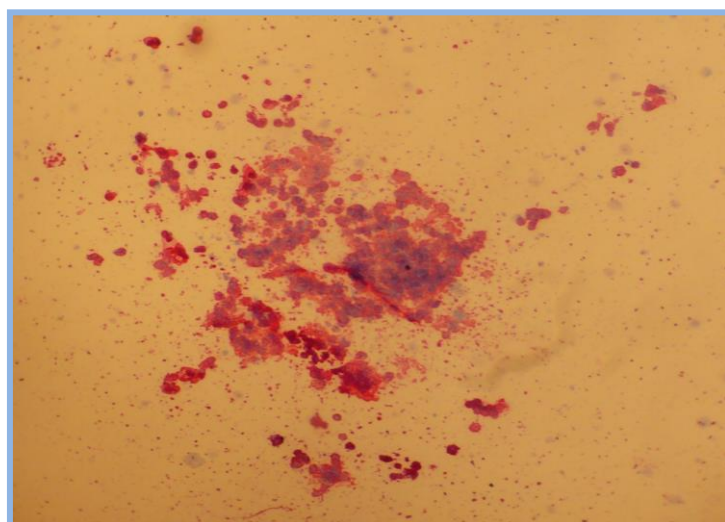


Fig. 3.3. Colonia megacariocítica (x125).

I.1.2.4- Ensayos de repoblación *in vivo*.

Los estudios de repoblación celular en modelos animales constituyen la estimación experimental más precisa del número de células madre. Consisten en trasplantar un producto celular a animales inmunotolerantes y observar su capacidad de dar origen a una linfohematopoyesis plurilineal completa. Para ello se utilizan ratones con

inmunodeficiencia combinada severa (SCID; NOD/SCID)^[42;43] o incluso ovejas a las que se trasplanta durante la vida intrauterina^[18;44].

Naturalmente, se trata de modelos experimentales complejos y costosos que no tienen lugar en la práctica clínica como estimadores de calidad de un producto para trasplante.

I.2- El trasplante de progenitores hematopoyéticos.

El TPH es un procedimiento terapéutico de introducción relativamente reciente en la práctica clínica y, por este motivo, sigue en plena evolución.

I.2.1- Historia.

Los experimentos en ratones en los que se basó el trasplante de médula ósea (TMO) humano se efectuaron hace más de 50 años, aunque en 1891 Brown ya había administrado MO a sus pacientes por vía oral como tratamiento para trastornos hematológicos^[45].

En 1939, Rasjek y Osgood administraron a sus pacientes MO (intramedular y endovenosa) para tratar leucemias y aplasia medular. En este mismo año se realizó el primer intento de recuperación hematopoyética administrando transfusiones en un paciente con anemia aplásica utilizando una pequeña cantidad de MO de su hermano pero sin ningún tratamiento condicionante previo^[46].

Tras la finalización de la Segunda Guerra Mundial se despertó entre la comunidad científica un notable interés en torno a los efectos de la radiación ionizante sobre los organismos vivos^[47]. En el seno de este movimiento, Jacobson y *col.*^[48] en 1949 demostraron que los ratones irradiados letalmente podían recuperar su hematopoyesis si se protegía el bazo de las radiaciones, lo que demostraba el papel de este órgano como parte del sistema hematopoyético^[49]. Posteriormente, cuando se identificó la aplasia medular en la población japonesa expuesta a los efectos radiactivos de las explosiones de las bombas atómicas como

una causa importante de muerte, se aceleraron las investigaciones en animales en relación con la cantidad de irradiación corporal necesaria para provocar aplasia medular, y se establecieron las bases para una aplicación clínica más racional del TPH. Poco tiempo después, en 1951, Lorenz describió que la infusión de células de la MO de un ratón a otro, podía rescatar la aplasia producida por irradiación letal^[50;51]. Sin embargo, los intentos iniciales de aplicar esta metodología a pacientes hematológicos graves fueron un fracaso porque se desconocía la importancia de la similitud de los antígenos de histocompatibilidad así como la necesidad de tratamiento inmunosupresor intenso. Los hallazgos en roedores posibilitan las experiencias piloto del grupo de E.D. Thomas sobre modelos caninos, que bien se pueden considerar el antecedente inmediato del TMO en humanos^[52].

En 1957, Thomas y *col.* publican el resultado de las primeras experiencias de TMO alogénico en humanos, en las que tan sólo se consiguió un injerto temporal en uno de los pacientes^[53]. Al poco tiempo, Mathé y *col.* publican su experiencia con la utilización de infusiones de médula ósea para tratar a un grupo de supervivientes de un accidente nuclear^[54]. Sin embargo, un análisis posterior de esta serie permite afirmar que los injertos conseguidos se debieron probablemente a una reconstitución hematopoyética autóloga^[47].

Estas experiencias pioneras precedieron al descubrimiento de los principios de la histocompatibilidad. En 1954, Miescher y Fauconnet describieron que los anticuerpos inducidos por transfusiones y embarazos reaccionaban con los antígenos presentes en los leucocitos humanos^[55]. Más tarde, en 1958, Dausset y Van Rood utilizaron estos anticuerpos para descubrir los grupos de antígenos de leucocitos humanos (HLA)^[56;57]. La introducción, a finales de los 60, de los estudios de compatibilidad en la selección del donante supuso un avance fundamental que, de alguna manera, inaugura la “era moderna” del TPH^[47;58;59].

En los años 50 se realizaron casi 200 trasplantes alogénicos de MO en humanos sin éxito a largo plazo pero se obtuvieron resultados prometedores^[60;61]. A finales de los 60 ya existía un

soporte adecuado de plaquetas, una mejora en el tratamiento antibiótico y un desarrollo mayor de agentes antineoplásicos.

Los primeros trasplantes alogénicos con éxito se realizaron en 1968 y 1969 en 2 pacientes afectos de inmunodeficiencia congénita y enfermedad de Wiskott-Aldrich respectivamente, que sobrevivieron al TPH^[62;63].

Desde los primeros años de desarrollo del TPH, la posibilidad de utilizar la médula del propio paciente se había considerado con gran interés. El camino hacia el desarrollo completo de esta técnica se despejó al describirse los métodos de criopreservación que permiten mantener el tejido hematopoyético medular viable durante largos periodos de tiempo^[64-66]. Los primeros trasplantes autólogos en humanos se realizaron en 1950 por Kurnick^[67] y por McGovem en 1959^[68]. Estos implantes parecían proteger contra la toxicidad medular pero su beneficio clínico era incierto debido a que no se erradicaba la enfermedad de base, según se describen en las primeras experiencias tras una irradiación corporal total. El resultado clínico de los primeros trasplantes autólogos se vio fuertemente condicionado por varias limitaciones: la modesta eficacia de la irradiación corporal total por sí sola como tratamiento antileucémico, la grave situación clínica de los pacientes seleccionados para estos estudios (generalmente con enfermedad refractaria o en recaída), la ausencia de un soporte transfusional adecuado y la falta de antibióticos y antifúngicos de amplio espectro con un perfil de toxicidad adecuado.

El trasplante autólogo se empezó a realizar con éxito en pacientes con linfomas en los años 70 y su uso generalizó a más enfermedades en la década de los 80^[69].

El trasplante de sangre periférica (SP) se inició en 1962, cuando Goodman y Hodgson demostraron la existencia de PH en la sangre de los ratones^[70]. En los seres humanos los PH de sangre periférica se empezaron a recoger en pacientes en los que no se podían obtener células progenitoras medulares, ya fuera por su enfermedad de base o por irradiación previa, y su uso se amplió tras descubrir que los factores de crecimiento hematopoyéticos causaban un

aumento transitorio de los PH a la SP. En la década de los 80 la SP se generalizó como una fuente de PH para trasplante^[71].

Un paso decisivo para hacer viable la aplicación clínica en humanos de esta nueva fuente de PH fue el desarrollo de separadores celulares capaces de recolectar grandes cantidades de células de sangre periférica^[72]. Los primeros TPH autólogos realizados con células obtenidas de sangre periférica se llevaron a cabo en el Hammersmith Hospital de Londres^[73;74] y en el Johns Hopkins Hospital de Baltimore^[75]. Sin embargo, la fecha en que esta técnica termina de asentarse definitivamente en la práctica clínica hay que situarla entre 1985 y 1986. En esos años, grupos de seis instituciones de distintas partes del mundo publican experiencias de TPH utilizando células de sangre periférica^[76-82].

Otro factor que condicionó el éxito de este tipo de TPH fue el mejor conocimiento del fenómeno de movilización, por el cual el número de células progenitoras circulantes aumenta en determinadas circunstancias, como en la recuperación hematopoyética tras una aplasia inducida por quimioterapia o tras la aplicación de factores de crecimiento. Este fenómeno, así como sus posibles aplicaciones para recolectar grandes cantidades de células mediante aféresis, fue descrito por primera vez por Richman y *col.* en 1976^[83]. En los años siguientes se desarrollaron los procedimientos de movilización basados en el efecto descrito por estos autores y en la utilización de factores estimuladores de colonias hematopoyéticas^[29;84;85].

La descripción de una técnica rápida y reproducible para cuantificar los PH mediante citometría de flujo es otro de los hitos fundamentales en el desarrollo de estos tratamientos^[15]. Gracias a ella, el soporte hematopoyético de sangre periférica se puede concebir hoy como un tratamiento preciso, susceptible de dosificación.

Diversos estudios demostraron las ventajas del TPH autólogo de sangre periférica sobre el de medula ósea, fundamentalmente la reducción del tiempo de aplasia y la posibilidad de recoger el producto celular de forma ambulatoria y sin necesidad de anestesia^[86]. Como

producto de ello, la sangre periférica se convirtió durante la década de los 90 en la fuente de PH más utilizada para trasplante autólogo en la gran mayoría de los centros^[87;88] (fig. 4). En el caso del trasplante alogénico, el uso de los PH de sangre periférica siguió una evolución similar, aunque limitada por la existencia de una mayor incidencia de enfermedad injerto contra huésped crónica que con el uso de PH medulares^[89].

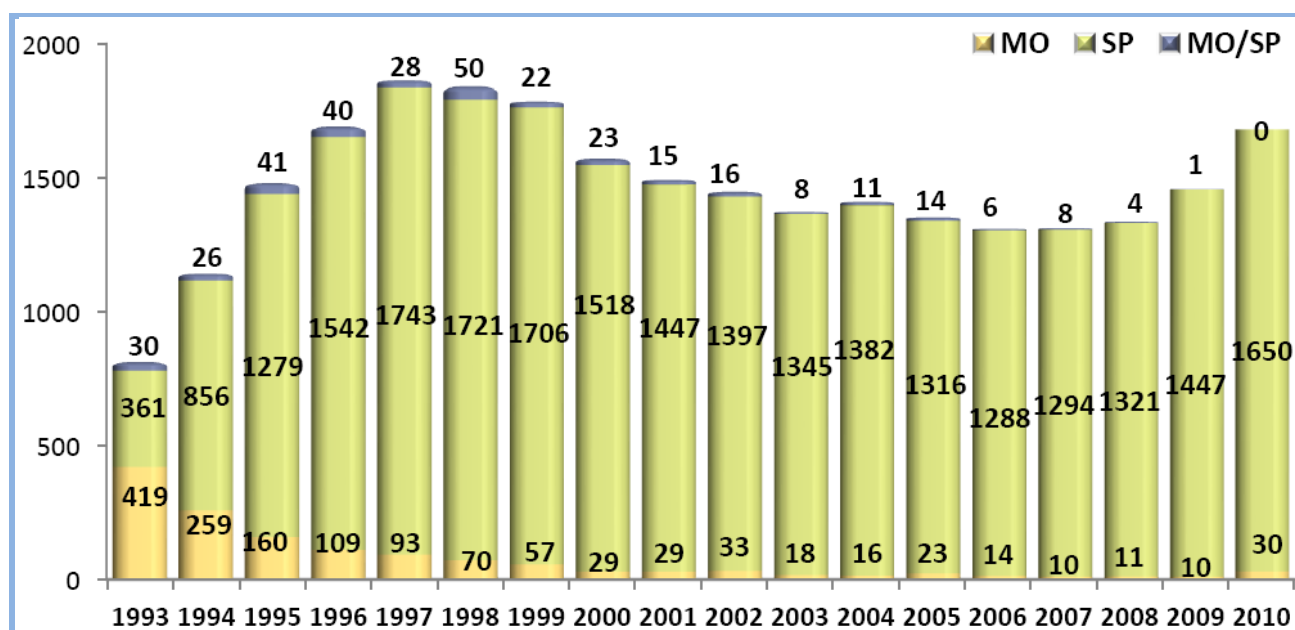


Fig. 4. Trasplantes de Progenitores Hematopoyéticos autólogos. España. 1993-2010. (Tomado de Organización Nacional de Trasplantes: "Memoria de actividad. ONT 2010", 2011, p 7).

Todos estos avances han contribuido a configurar el perfil actual del TPH. La futura evolución de este procedimiento es preciso contemplarla en el marco de una nueva disciplina en incesante expansión: la Terapia Celular. En este terreno se acoplan con los procedimientos terapéuticos convencionales las nuevas formas de trasplante hemopoyético, con acondicionamientos no necesariamente únicos ni mieloablativos^[90-93], las técnicas de inmunoterapia adoptiva celular, tanto autóloga^[93-96] como alogénica^[93;96], y la posibilidad de obtener progenitores de distintos orígenes^[97-99]. Además, el hallazgo de la plasticidad o versatilidad de las células hematopoyéticas^[100] y muy especialmente el reciente descubrimiento de las Células Progenitoras Multipotenciales del Adulto (MAPC) en la MO

humana^[101;102] permiten asegurar que al menos una buena parte del futuro de la terapia celular podrá seguir entendiéndose como la evolución natural del TPH^[103;104].

I.2.2- Objetivos e indicaciones.

El TPH tiene dos objetivos^[2;105-107]:

- a) La sustitución de la hematopoyesis y la inmunidad del paciente por ser total o parcialmente defectuosa, insuficiente o neoplásica, por una normal procedente de un donante sano (TPH alogénico). En este tipo de trasplante, se aporta además la actividad antitumoral de la celularidad inmunocompetente del injerto; efecto conocido como reacción del injerto contra la leucemia.
- b) Permitir la aplicación tratamientos antineoplásicos e inmunosupresores en dosis altas (mieloablativas), que permiten la erradicación poblaciones tumorales clonales y/o la recapitulación del sistema inmunológico. La infusión de PH de un donante sano (TPH alogénico), o del propio paciente (TPH autólogo), rescata la hematopoyesis y la inmunidad tras la aplicación de estos tratamientos.

Las principales indicaciones del TPH se reflejan en la tabla 1.

I.2.3- Tipos.

Se pueden considerar varios tipos de TPH en función del tipo de donante y según la procedencia de los PH^[106;121-123].

I.2.3.1- Según el tipo de donante^[124]:

- a) TPH Autólogo (autogénico, autotrasplante): si los progenitores son obtenidos del propio paciente con anterioridad al tratamiento antineoplásico en dosis altas.
- b) TPH Singénico o isogénico: a partir de un gemelo univitelino.
- c) TPH Alogénico: individuos de la misma especie, distintos a gemelo univitelino:

- 1) Emparentado: donante familiar, habitualmente hermano HLA idéntico.
- 2) No emparentado: donante no familiar.

Tabla 1. Indicaciones principales para la realización de TPH alogénico y/o autólogo.

LAM	TPH alogénico en 1ª o sucesivas remisiones ^[108-111] .
SMD	TPH alogénico en pacientes AR ^[107] .
LAL	TPH alogénico en pacientes AR en 2ª RC. TPH autólogo en AR con EMR negativa ^[112] .
LMC	Indicación reducida por uso inhibidores tirosínkinasa.
LNH agresivos o de alto grado	IPI desfavorable TASPE tras 1ª línea ^[113] o ≥ 2 remisiones ^[114;115] .
LNH bajo grado	TPH autólogo en pacientes en recaída ^[116] .
Linfoma de Hodgkin	TPH autólogo en recaída sensibles o enfermedad refractaria primaria ^[117] .
Mieloma múltiple	TPH autólogo en 1ª línea y tratamiento de rescate ^[118] para prolongar la supervivencia ^[119] .
LMMJ	TPH alogénico ^[107] .
Enfermedades no tumorales^[107]: - Anemia aplásica. - Hemoglobinuria paroxística nocturna. - Anemia de Fanconi. - Anemia Blackfan-Diamond. - <i>Talasemia major</i> . - Anemia falciforme. - Inmunodeficiencia combinada severa. - Síndrome Wiskott-Aldrich. - Errores congénitos del metabolismo.	TPH alogénico.
Tumores sólidos^[107]: - Sarcoma/PNET. - Tumores SNC (incluyendo Neuroblastoma). - Tumores células germinales. - Tumores epiteliales (Ca mama, ovario y pulmón).	Aumento TPH autólogo en Sarcoma/PNET; Tumores SNC (incluyendo Neuroblastoma); Tumores células germinales. Descenso TPH autólogo en Tumores epiteliales.
Enfermedades autoinmunes (más frecuentes)^[120]: - Esclerosis múltiple. - Esclerodermia. - Artritis reumatoide. - Artritis juvenil. - Lupus eritematoso sistémico.	TPH autólogo en EAI severa, que no respondan a tratamiento convencional y realizarse antes de daño orgánico irreversible. TPH alogénico no claras indicaciones.

LAM: Leucemia aguda mieloide. **SMD:** Síndrome mielodisplásico. **LAL:** Leucemia aguda linfoblástica. **LMC:** Leucemia mieloide crónica. **LNH:** Linfoma no Hodgkin. **LMMJ:** Leucemia mielomonocítica juvenil. **PNET:** Tumores neuroectodérmicos primitivos. **SNC:** Sistema nervioso central. **TPH:** Trasplante progenitores hematopoyéticos. **AR:** Alto riesgo. **RC:** Remisión completa. **EMR:** Enfermedad mínima residual. **TASPE:** Trasplante autólogo progenitores hematopoyéticos de sangre periférica. **EAI:** Enfermedades autoinmunes.

I.2.3.2- Según la procedencia de los progenitores hematopoyéticos:

- a) Trasplante de médula ósea: obtenido mediante aspirados medulares múltiples en crestas ilíacas posteriores, anteriores, esternón o meseta tibial.

- b) Trasplante de progenitores de SP: obtenidos mediante procedimientos de aféresis, después de la movilización de progenitores hemopoyéticos hacia sangre periférica.
- c) Trasplante de progenitores de sangre de cordón umbilical (SCU): se recogen mediante punción de la vena umbilical placentaria inmediatamente después del parto.

1.2.4- Etapas del trasplante de progenitores hematopoyéticos.

En el TPH se distinguen las siguientes etapas^[106;125] (fig. 5.1-5.2):

a) Acondicionamiento: el tratamiento o régimen de acondicionamiento se efectúa en los días previos a la infusión de los progenitores hematopoyéticos^[126]. Generalmente incluye una combinación de radioterapia y/o quimioterapia en dosis mieloablativas. Según la intensidad de acondicionamiento podemos dividirlo en^[125]:

a.1) *mieloablativo*: consiste en la administración de altas dosis de quimioterapia, radioterapia o ambas, simultánea o secuencialmente, con el objetivo de:

a.1.1) Eliminar las células hemopoyéticas y tumorales del receptor.

a.1.2) Crear espacio medular para la posterior proliferación de los precursores trasplantados.

a.1.3) Inmunodeprimir al paciente para reducir al mínimo el riesgo de rechazo en el caso de alotrasplante.

a.2) *De intensidad reducida*: administración de potentes inmunodepresores que facilitan el implante y progresiva sustitución de la hemopoyesis del paciente por la del donante.

El régimen de acondicionamiento también puede aumentar la respuesta inmunológica antitumoral, ya que al destruir las células neoplásicas se exponen nuevos péptidos tumorales a las células presentadoras de antígenos y éstas los exponen a los linfocitos T, que se activan y pueden eliminar las células neoplásicas residuales^[125].

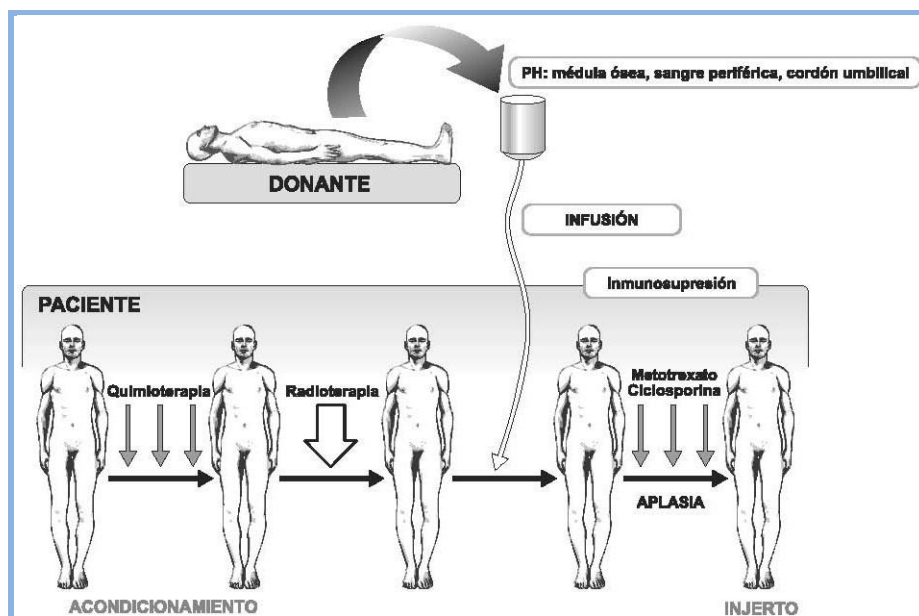


Fig. 5.1. Esquema del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. (Tomado de Moraleda JM y col: "Trasplante de progenitores hematopoyéticos"; en Moraleda JM: Pregrado de Hematología, 2011, p 482).

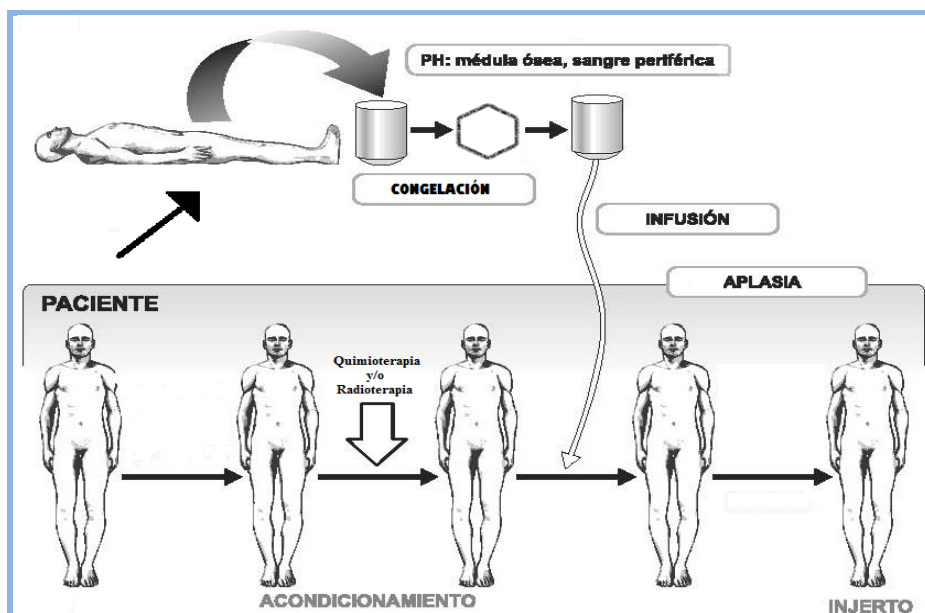


Fig. 5.2. Esquema del trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos.

Existen numerosos esquemas de acondicionamiento para TPH alogénico y autólogo. El dilema actual es cómo conseguir controlar la enfermedad con la mínima toxicidad utilizando los múltiples tratamientos disponibles. El diseño de los mismos suele ser empírico y se han

publicado muy pocos estudios aleatorizados que definan la superioridad de un régimen frente a otro^[127]. Los estudios para el desarrollo de nuevos regímenes de acondicionamiento que exploren las posibilidades de nuevos fármacos^[128] o de nuevos esquemas de administración^[90;129] y su posterior ensayo en estudios controlados son esenciales para llegar a conocer y aprovechar a fondo todo el potencial del trasplante hematopoyético.

Recientemente, se ha descubierto que nuevos fármacos con alto poder inmunosupresor como la globulina antitimocítica (ATG), la irradiación ganglionar total, la irradiación corporal total en dosis bajas (2 Gy) y la fludarabina pueden ser suficientes para obtener la tolerancia al injerto alogénico e impedir el rechazo, sin necesidad de emplear altas dosis de quimiorradioterapia. Estos trasplantes alogénicos con acondicionamientos de intensidad reducida (AIR), o no mieloablativos, basan su eficacia en el poderoso efecto citotóxico de los linfocitos T del donante contra las células neoplásicas del receptor. Los AIR han supuesto un gran avance, ya que al disminuir la toxicidad se pueden aplicar a personas de más edad o con comorbilidades en los que esté indicado un trasplante alogénico^[125;126].

La combinación de irradiación corporal total y ciclofosfamida, es el régimen de acondicionamiento más utilizado en el TPH para las enfermedades neoplásicas. En caso de no utilizar radioterapia, la combinación de busulfán y ciclofosfamida es el estándar^[130].

Actualmente existen una gran variedad de regímenes de acondicionamiento que varían según la enfermedad de base y el estado general del paciente. Con este enfoque se utilizan regímenes como el BEAC (carmustina, etopósido, citarabina y ciclofosfamida)^[131] y el CBV (ciclofosfamida, carmustina y etopósido)^[132] para linfomas o el melfalán a dosis altas para el mieloma^[133;134].

b) Obtención de los precursores hemopoyéticos: en el caso del autotrasplante deben obtenerse con anterioridad al acondicionamiento, y criopreservarse hasta su posterior

utilización. En el caso del trasplante alogénico, lo más habitual, es obtenerlos el mismo día del trasplante.

c) Manipulación *ex vivo* del inóculo: tiene diferentes objetivos, como la eliminación de las células neoplásicas en el caso del autotrasplante, la disminución de los linfocitos T para reducir el riesgo de enfermedad injerto contra huésped (EICH) en el alogénico, aumentar el número de precursores mediante técnicas de expansión en el trasplante de cordón umbilical, o la retirada de los hematíes en el caso de trasplante alogénico con incompatibilidad mayor ABO.

d) Conservación de los progenitores hematopoyéticos: se pueden mantener en fresco hasta su infusión si su utilización es inmediata tras su obtención, o criopreservados a -80°C o a -196°C si la infusión se realiza de forma diferida.

e) Infusión de los precursores hematopoyéticos: debe realizarse por medio de un catéter venoso central ^[106]. El día que se infunden los progenitores se denomina día 0. Durante la infusión de PHSP criopreservados los pacientes pueden presentar toxicidad relacionada con alguno de sus componentes, principalmente el dimetilsulfóxido (DMSO), los restos celulares, la hemoglobina libre y los agregados plaquetarios ^[135]. La toxicidad relacionada con el DMSO es proporcional al volumen del mismo infundido ^[136]. Estudios recientes han mostrado que la cantidad de granulocitos en el producto criopreservado el predictor más relevante de los efectos adversos ^[137-139]. La toxicidad relacionada con la infusión es variable y en general existen pocos efectos adversos severos; sin embargo, puede ser muy relevante en pacientes que presentan uno o más fallos orgánicos, debido a su enfermedad de base o a los tratamientos previos.

Unas horas después de su infusión, los PH desaparecen de la SP y anidan en los territorios medulares, donde comienzan su proliferación y diferenciación ^[140;141].

f) Fase aplásica. Tras el acondicionamiento aparece un periodo de aplasia profunda, que es el origen de la mayor parte de la morbilidad y mortalidad que sufren los pacientes sometidos a un TPH autólogo a corto y medio plazo^[108;109;111;119;142-144].

El tratamiento con quimio-radioterapia a alta dosis, unido al efecto de los tratamientos anteriores y a la propia neoplasia del paciente, compromete casi todos los mecanismos del sistema inmunitario^[145;146]. De entre todos ellos, la neutropenia profunda es la que se asocia con un riesgo de complicaciones infecciosas, que son las responsables de la mayoría de los fallecimientos en el postrasplante inmediato^[144]. Para prevenirlas se utilizan diversas estrategias como el ingreso en condiciones de aislamiento invertido, la antibioterapia profiláctica, o el tratamiento antibiótico empírico precoz de amplio espectro. Sin embargo, hasta que aparece el injerto hematopoyético el riesgo de una infección grave bacteriana o fúngica sigue siendo elevado. La disminución del tiempo hasta el injerto es lo que se persigue con la administración de factores de crecimiento postrasplante^[147]. Su mecanismo de acción consiste en estimular la proliferación y diferenciación de los precursores granulocíticos, por lo que en ausencia de éstos, su efecto no se hace evidente^[148].

También aparece una trombopenia muy severa que hace necesaria la administración de transfusiones de plaquetas profilácticas. A pesar de ellas, pueden aparecer episodios hemorrágicos severos responsables en parte de la mortalidad^[144]. Las infecciones o las toxicidades de órganos como el hígado o la mucosa digestiva contribuyen al problema, al aumentar el consumo periférico de plaquetas, disminuir el rendimiento de las transfusiones, proporcionar focos de sangrado o comprometer otros mecanismos de la hemostasia^[10].

Junto con las infecciones y las hemorragias, la toxicidad orgánica no hematológica de los citostáticos a alta dosis constituye otra fuente importante de morbilidad en el TPH^[149].

El tiempo hasta el injerto hematopoyético es variable de unos pacientes a otros y es dependiente de múltiples factores: el tipo de neoplasia y su estado al trasplante, la

infiltración medular, el tratamiento previo acumulado con citostáticos o con radioterapia, el tipo de acondicionamiento, el número de PH que se trasplantan y el uso de factores de crecimiento postrasplante, entre otros^[10].

g) Recuperación hematológica: Se entiende como injerto hematopoyético a la recuperación mantenida de cifras de neutrófilos en sangre periférica por encima de $0,5 \times 10^9/L$ y de plaquetas por encima de $20 \times 10^9/L$, sin soporte hemoterápico^[140;141].

Suele iniciarse en entre el día +10 y el día +21, es más precoz cuando se emplea PHSP que con la médula ósea, y cuando es alta la dosis de células CD34+ infundidas^[10]. Factores como la persistencia de enfermedad en el momento del trasplante y quimioterapia acumulada pretrasplante se asocian con un injerto más lento y con un mayor consumo de hemoderivados^[10].

h) Reconstitución inmune: durante los primeros 6 meses postrasplante hay disminución de las células CD4+ y respuesta deficiente de los linfocitos T. La inmunidad humoral tarda en recuperarse entre 6-18 meses.

1.2.5- Fuentes de progenitores hematopoyéticos.

Las fuentes de las que podemos obtener PH son: la médula ósea, sangre periférica movilizada y sangre de cordón umbilical.

La mayoría de PH residen en la médula ósea y por tanto ésta ha sido tradicionalmente la fuente de estas células para trasplante. En circunstancias normales un 1%-3% de las células de la médula pueden ser CD34+ pero durante su recolección, un rango del 25 al 75% del material aspirado es sangre periférica, haciendo que el recuento de células CD34+ sea significativamente dependiente de la calidad del producto recogido^[150].

En la práctica, la extracción de médula tiene el objetivo de recolectar una dosis de al menos 3×10^8 /células mononucleadas totales/Kg. Esta cantidad representa el 1-5% del volumen total medular y se estima que proporciona 3×10^6 células CD34+/Kg paciente^[150].

Los PH circulan en la sangre periférica en cantidades muy pequeñas, 1-9 células CD34+/mL^[151]. Sin embargo estas células aumentan de forma transitoria en SP tras la administración de quimioterapia y de los factores de crecimiento hematopoyéticos como el G-CSF o el GM-CSF^[152]. Estos procedimientos son muy efectivos movilizando los PH a sangre periférica (hasta 20-100 veces la concentración basal), aunque existen factores que influyen en la movilización como la enfermedad de base del paciente, la presencia de tumor o fibrosis medular o la administración previa de radioterapia pélvica o quimioterapia^[153-155]. El objetivo en la recolección de PHSP es conseguir una dosis superior a 2×10^6 células CD34+/Kg de receptor^[10] aunque dosis superiores a 5×10^6 células CD34+/Kg se correlacionan con un injerto más rápido^[156].

La sangre de cordón umbilical (SCU) como fuente de PH ha representado un avance significativo en el contexto del TPH alogénico, en particular para los pacientes sin hermano HLA-compatible que no encuentran un donante no emparentado apropiado^[157]. Además, la SCU está disponible en una media de 19 días, mientras que el tiempo requerido para encontrar un donante no emparentado HLA-compatible es de 49 días, un factor relevante para aquellos pacientes que necesitan un TPH urgente^[158].

La elección de la fuente de progenitores para un TPH se basa en la urgencia del trasplante y en las diferentes capacidades de injerto e inmunomodulación que aportan estos inóculos, por lo que debe ajustarse a las necesidades de cada paciente. En el caso del TPH autólogo, el 90% de los trasplantes se realizan a partir de PH de sangre periférica.

I.2.6- Movilización de progenitores hematopoyéticos.

Durante la vida embrionaria y fetal tiene lugar un intenso tráfico de PH a través de la sangre periférica. Este fenómeno es la continuación del movimiento migratorio que establece la actividad hematopoyética en el hígado fetal en las primeras semanas de desarrollo. En realidad, este tráfico de progenitores continúa a lo largo de toda la vida, aunque de forma mucho más limitada, y es un fenómeno de gran importancia fisiológica para la homeostasis hematopoyética^[10].

En el adulto el número de PH circulantes en situación basal es muy reducido. Brown y *col.* encuentran una media de 4.3 células CD34+/ μ L en una muestra de 47 donantes sanos^[152]. En pacientes previamente tratados con quimioterapia es la norma encontrar cifras aún menores. En determinadas circunstancias fisiológicas, como el ejercicio, se produce un aumento moderado de los niveles de progenitores circulantes^[159]. Sin embargo, desde el punto de vista del trasplante tienen mucha mayor trascendencia los aumentos que se producen durante la recuperación de una aplasia tras un ciclo de quimioterapia o tras la administración de determinadas citoquinas, por tratarse de incrementos importantes y reproducibles, y por tanto susceptibles de ser usados para obtener células para su uso terapéutico^[10]. El aumento del número de progenitores circulantes mediado por cualquier circunstancia recibe el nombre de movilización.

Los mecanismos por los cuales se produce la movilización de progenitores aún no han sido definitivamente esclarecidos. En general, se acepta que los PH movilizados proceden de la médula ósea. Se ha demostrado que el tratamiento con G-CSF, la citoquina más utilizada para la movilización, altera los mecanismos de adhesión de las células progenitoras al microambiente medular, facilitando su salida hacia el torrente sanguíneo^[159]. El fenómeno de movilización parece estar más ligado a la liberación de los anclajes que fijan las células a la

médula que a un aumento de la proliferación de los progenitores^[160;161] como el receptor CXCR4 presente en la superficie de las células CD34+ que se une a su ligando SDF1^[9].

El primer procedimiento de movilización que se explotó para su uso clínico fue el que libera células progenitoras a la sangre durante la recuperación de una aplasia postquimioterapia^[85]. Una de las conclusiones de estas experiencias fue que los regímenes capaces de producir una neutropenia profunda (por debajo de $0,5 \times 10^9/L$) son los que tienen más posibilidades de generar una respuesta movilizadora suficiente^[162]. Los inconvenientes fundamentales de este tipo de movilizaciones vienen dados por las complicaciones clínicas asociadas y por la variabilidad entre pacientes en la dinámica de recuperación, que hace difícilmente programable la recolección.

La asociación de factores de crecimiento recombinantes al mecanismo anterior, ya sea GM-CSF^[29], G-CSF^[163;164] o interleukina 3 asociada a GM-CSF^[165], contribuyó a disminuir la duración de las aplasias, a hacer algo más reproducible la dinámica de la movilización y a conseguir movilizaciones más intensas.

El efecto movilizador del G-CSF administrado en una situación de hematopoyesis basal se apreció por primera vez a finales de los años 80^[166]. Posteriormente, Sheridan y col.^[84] demostraron que tras la administración de 12 mcg/Kg al día de G-CSF se multiplicaba por 58 la cifra basal absoluta de CFU-GM en la sangre periférica y ello permitía recolectar un número suficiente de progenitores como para acelerar la dinámica de injerto respecto de controles históricos de TPH autólogo. Estudios posteriores confirmaron que la movilización con G-CSF incluye tanto progenitores con un grado intermedio de diferenciación como progenitores inmaduros^[166]. En cuanto al número total de células CD34+, la movilización con G-CSF es similar a la obtenida con la combinación de quimioterapia con un factor de crecimiento^[167;168]. Además, la cinética de movilización con G-CSF es predecible, segura y

prácticamente exenta de toxicidad, por lo que se ha convertido en el esquema de movilización más utilizado.

I.2.7- Recolección celular.

La obtención de PH de sangre periférica para el trasplante se basa en la utilización de procesadores celulares de aféresis. Estos equipos son capaces de separar componentes sanguíneos a escala clínica, de forma automática y en un sistema cerrado. Un mecanismo de centrifugación permite discriminar los distintos componentes de la sangre de acuerdo a su densidad. Las características morfológicas y la densidad de los PH son similares a las de las células linfoides^[169]. Además, los PH constituyen un porcentaje mínimo de los leucocitos, casi siempre inferior al 1% incluso después de una movilización satisfactoria. Por ello, los programas de recolección de PHSP mediante leucoaféresis incluyen toda la población de células mononucleadas, con la seguridad de que entre ellas se encuentran las células progenitoras^[10].

Los procesadores más idóneos para la recolección de PH son los denominados de flujo continuo. Estos sistemas utilizan simultáneamente durante todo el proceso dos accesos venosos, uno para extraer la sangre del donante y otro para devolvérsela deplecionada del componente que está recogiendo. De esta manera se consigue que el volumen de sangre en el circuito extracorpóreo sea mínimo y que la devolución al paciente de sangre anticoagulada con quelantes del calcio sea paulatina, mejorando su tolerancia. En conjunto, con los procesadores de flujo continuo es posible procesar mayores volúmenes de sangre y conseguir un mejor rendimiento que con los de flujo discontinuo (equipos que utilizan una sola vía por la que extraen y devuelven la sangre alternativamente)^[10].

II. Criobiología y progenitores hematopoyéticos.

El producto celular recolectado por aféresis debe mantenerse en unas condiciones que garanticen su viabilidad y funcionalidad hasta el momento adecuado para su infusión. Aun en los casos en que el trasplante autólogo sigue inmediatamente a la recolección, este periodo de tiempo rara vez es inferior a una semana. Se trata del tiempo mínimo necesario para concluir la recolección, administrar el tratamiento de acondicionamiento y respetar un periodo de entre uno y tres días para que el organismo metabolice y elimine completamente los citostáticos. Aunque se han ensayado otras alternativas^[92;170], el procedimiento más utilizado para conservar los PH durante este intervalo es la criopreservación.

II.1- La membrana citoplasmática.

II.1.1- Estructura de la membrana citoplasmática.

La estructura y composición de la membrana citoplasmática determina los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación celular. El comportamiento de la membrana celular durante la congelación y descongelación definirá los índices de supervivencia del inóculo descongelado^[13].

La membrana de las células eucariotas, independientemente de su composición, tiene una estructura organizada según el modelo de mosaico fluido de SJ. Singer y GL. Nicholson^[171] (fig. 6). Así, las membranas citoplasmáticas son bicapas lipídicas continuas en las que las proteínas están intercaladas y por las que los lípidos pueden difundir a través de la monocapa en la que se encuentran^[172]. Estas membranas se componen de lípidos anfipáticos, proteínas y un pequeño porcentaje de carbohidratos (los carbohidratos pueden estar unidos a lípidos o proteínas formando glicolípidos y glicoproteínas respectivamente). A modo de ejemplo, la membrana citoplasmática de los eritrocitos se compone de un 49%

de proteínas, un 43% de lípidos y un 8% de carbohidratos^[173]. Aunque la composición en porcentaje de peso seco es similar para los lípidos y las proteínas en las membranas citoplasmáticas, existen muchas más moléculas de lípidos porque son moléculas más pequeñas; una relación 100:1 de moléculas de lípido:proteína es lo más habitual pudiendo ser de hasta 400:1 en células especializadas como las gliales (mielina). En membranas mitocondriales esta relación disminuye hasta 30:1 por el alto contenido en proteínas específicas^[172].

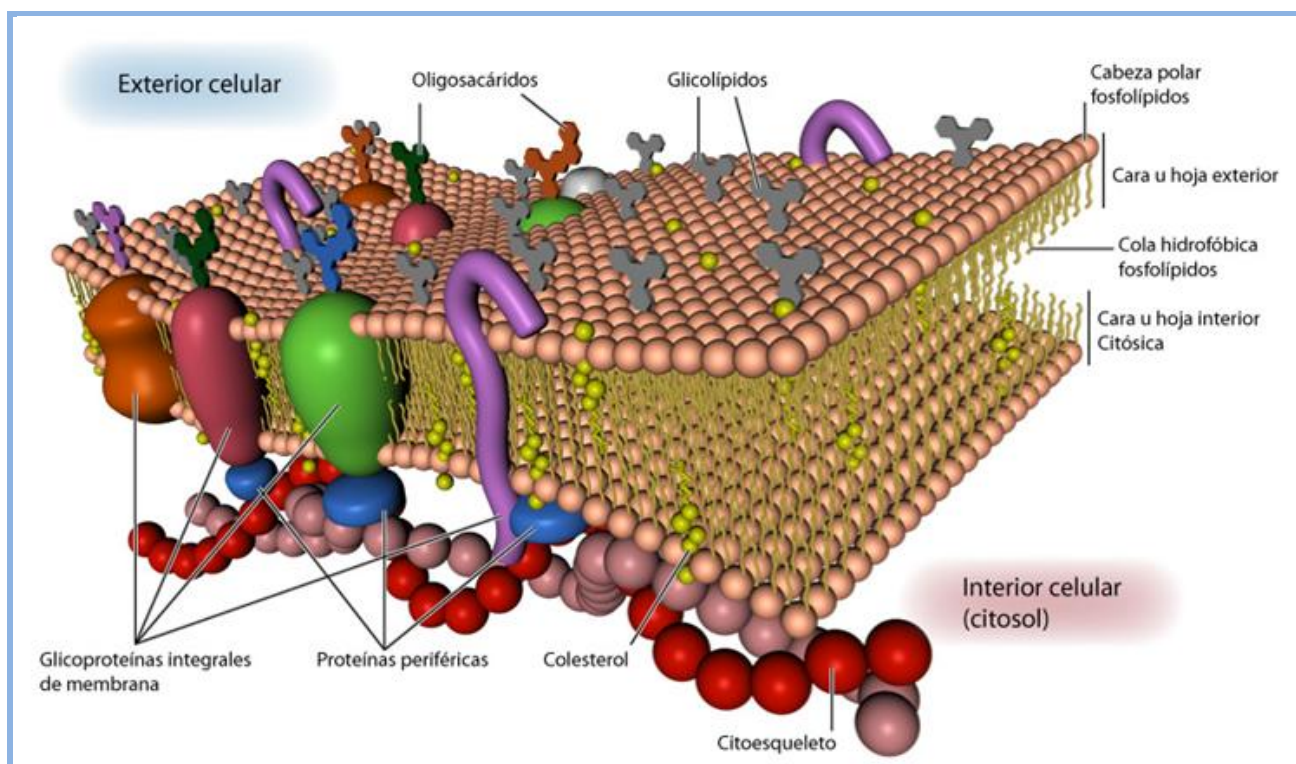


Fig. 6. Esquema de la membrana plasmática según el modelo de mosaico fluido de Singer y Nicholson. (Tomada de http://www.educared.org/wikiEducared/La_membrana_plasm%C3%A1tica.html, acceso 10/07/12).

La membrana citoplasmática funciona como una barrera semipermeable permitiendo el paso de pequeñas moléculas, pero impidiendo el flujo de las moléculas orgánicas producidas en su interior, actuando por tanto como una barrera permeable selectiva.

El tamaño de la partícula, su polaridad y la carga iónica determinan el paso a través de las membranas y de esta forma, pequeñas moléculas como las de agua, etanol, glicerol y oxígeno pasan a través de la membrana, mientras que la glucosa no lo hace. En general, cuanto menos polar es una molécula (más hidrofóbica) más rápido puede pasar la membrana porque puede “disolverse” en la bicapa; las membranas son altamente impermeables a las moléculas cargadas o iones.

II.1.2- Composición de la membrana citoplasmática.

Los lípidos, como componentes más abundantes de la membrana citoplasmática, determinan la fluidez y resistencia de la membrana durante los procesos de criopreservación. Los lípidos más abundantes en las membranas citoplasmáticas de las células eucariotas son el colesterol y los fosfolípidos, que se encuentran en similares concentraciones molares. Los glicolípidos constituyen habitualmente un 2% de los lípidos de membrana y su porción carbohidratada está exclusivamente expuesta en la parte externa de la membrana, sugiriendo una función de señalización y/o comunicación intercelular para estos lípidos^[174].

La estructura de los lípidos más abundantes de la membrana se presenta a continuación:

- Fosfolípidos: Estructuras anfipáticas organizadas por un grupo polar (colina, serina, etanolamina) y uno apolar formado por dos ácidos grasos de longitud de cadena variable (14-24 átomos de carbono). Normalmente, una de las cadenas arílicas no contiene dobles enlaces (saturada) mientras que la otra si los contiene (insaturada)^[172].
- Colesterol: Estructura de esteroide, con 4 anillos hidrocarbonatos unidos (ciclopentanoperhidrofenantreno) de los que cuelgan una cola hidrocarbonada y un grupo hidroxilo (polar) en el lado contrario^[174].

El empaquetamiento y la posición de estas moléculas en las bicapas determinarán la rigidez de las membranas y por tanto el transporte de moléculas. Este transporte a través de las membranas es el punto crítico para la supervivencia celular post-descongelación.

II.1.3- Empaquetamiento de los lípidos de membrana.

En las bicapas, los ácidos grasos de los fosfolípidos se posicionan en paralelo los unos a los otros mientras que el colesterol se intercala entre ellos. Este empaquetamiento de las cadenas hidrofóbicas hace que interaccionen entre ellas y se estabilicen por fuerzas de van der Waals. Cuanto más difícil sea este empaquetamiento más fluida será la membrana. Cuanto más larga es la cadena del ácido graso, más fácilmente se forman estas uniones y más rígida es la membrana^[172].

Asimismo, la existencia de dobles enlaces en las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos introduce cambios de orientación en las cadenas y hace que estas moléculas no interaccionen tan fácilmente entre sí y por tanto que la membrana sea más fluida (fig. 7.1-7.2). La presencia de moléculas de colesterol en la bicapa le proporciona rigidez a temperaturas fisiológicas por la unión de sus anillos a las cadenas de ácidos grasos (impide su libre movimiento y por tanto disminuye la fluidez) pero impide, por razones estéricas, que las cadenas de ácidos grasos se empaqueten libremente (cristalicen) al disminuir la temperatura, aumentando en ese momento, la fluidez de las membranas^[172].

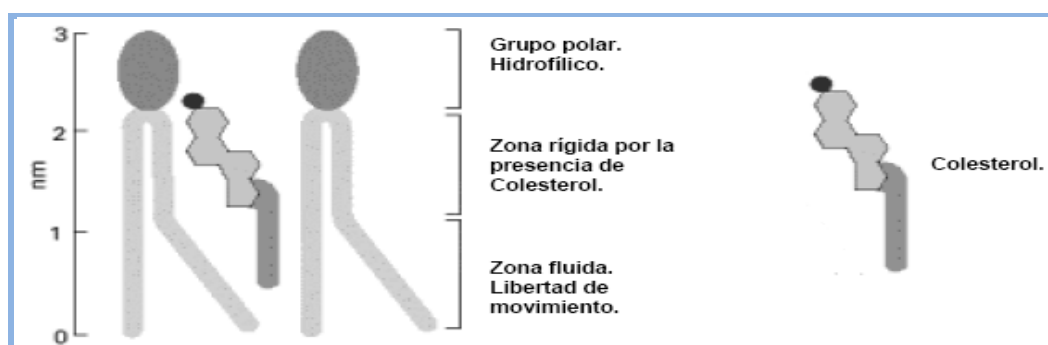


Fig. 7.1. Posición de los fosfolípidos y el colesterol en las membranas plasmáticas. (Modificado de Rodríguez L: "Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados: control de calidad, estabilidad osmótica y lavado de DMSO", Universitat Autònoma Barcelona, 2005, p 15).

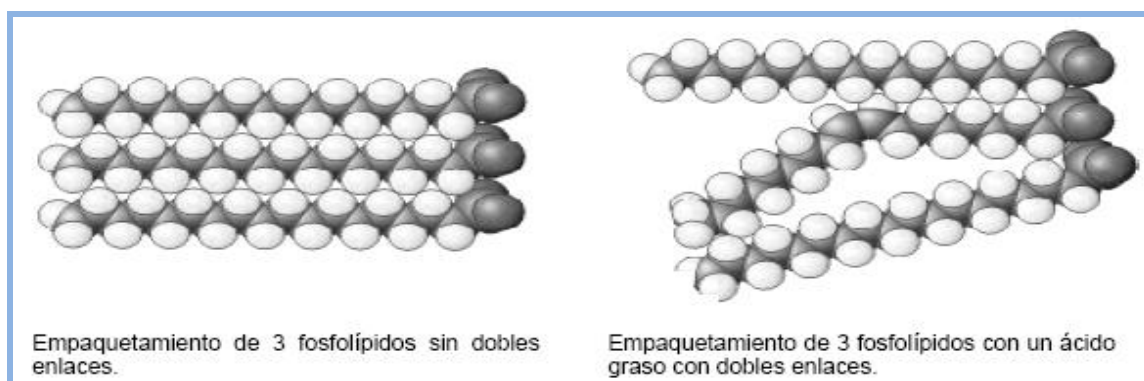


Fig. 7.2. Influencia de los dobles enlaces en el empaquetamiento de membrana. (Modificado de Rodríguez L: "Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados: control de calidad, estabilidad osmótica y lavado de DMSO", Universitat Autònoma Barcelona, 2005, p 15).

II.2- Respuesta celular a las bajas temperaturas.

II.2.1- Conceptos generales.

La viabilidad celular asociada a los procesos de criopreservación depende casi exclusivamente de la integridad de la membrana. Los procesos de congelación y descongelación producen un movimiento de solutos y de moléculas de agua a través de las membranas celulares que pueden superar la resistencia física de éstas. En este sentido la mayoría de los procesos de transporte a través de membrana dependen de la fluidez de ésta, que a su vez depende de las propiedades de las cadenas de ácidos grasos y de la temperatura^[175].

Los ácidos grasos pueden existir en un estado rígido ordenado (gel) o en uno más flexible y relativamente desordenado (fluido). La transición de un estado al otro se da en un rango de temperaturas, la media del cual se conoce como temperatura de transición de fase (Temperatura Melting, T_m)^[172;174]. Esta T_m será mayor o menor dependiendo la composición de los ácidos grasos que componen la membrana, esto es, el grupo polar, la longitud del grupo acilo y la saturación de la cadena. La mayoría de las membranas de células eucariotas tienen su T_m entre los 0°C y los 20°C^[176].

La transición de fase de una membrana citoplasmática no se da simultáneamente en todos sus fosfolípidos y por tanto se espera la coexistencia de dominios en estado fluido y dominios en estado sólido (gel) durante la transición^[177]. Esta situación produce defectos en el empaquetamiento de las membranas y está asociado a una mayor permeabilidad de solutos a través de la membrana. Así, se ha demostrado que al alcanzar la T_m en una bicapa determinada, se produce la mayor pérdida de solutos a través de la membrana^[176]. Alternativamente, se ha propuesto la pérdida de lípidos de membrana durante la deshidratación celular que tiene lugar en el proceso de congelación como un mecanismo mediante el cual la membrana citoplasmática pierde capacidad de expansión durante la rehidratación, al volver a condiciones isotónicas, comprometiendo en ese momento la integridad de membrana^[178].

Por último, las bajas temperaturas (asociadas al aumento de la rigidez de membrana) y la rapidez (décimas de segundo) a la que suceden los cambios osmóticos en los procesos de congelación y descongelación hace muy difícil el movimiento de moléculas a través de la membrana, sea mediante procesos de transporte activo (dependientes de adenosíntrifosfato o ATP, y en donde la disminución de T^a de 25°C a 10°C reduce en un 60% la actividad de las bombas dependientes de ATP)^[179], procesos de difusión facilitada o cotransporte (transporte concomitante de dos moléculas a través de la membrana dependiente una de ellas de ATP y/o iones H^+) (fig. 8). En consecuencia, los procesos de difusión y ósmosis son los que predominan en los momentos de estrés osmótico^[174] asociados a la congelación y descongelación y, adicionalmente, los que conducirán el movimiento de agua a través de la membrana y su integridad.

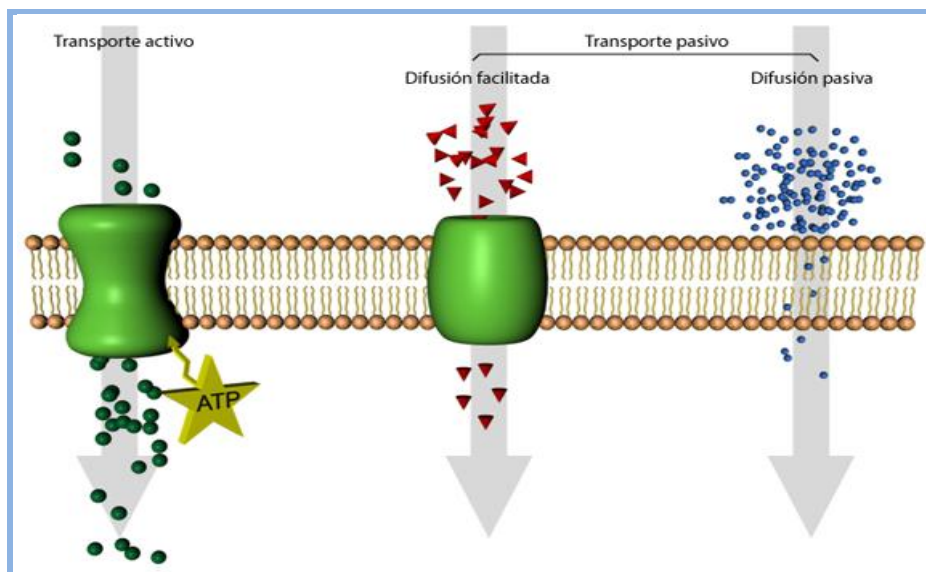


Fig. 8. Tipos de transporte: activo y pasivo.

(Tomada de http://www.educared.org/wikiEducared/La_membrana_plasm%C3%A1tica.html, acceso 10/07/12).

II.2.2- Difusión y ósmosis.

La difusión es el movimiento continuo de moléculas en los líquidos con tendencia a alcanzar una distribución homogénea en todo el espacio que les es accesible, por ejemplo, el intercambio de nutrientes entre el plasma sanguíneo y las células del cuerpo tiene lugar en el lecho vascular por difusión^[175].

La expansión de una sustancia se debe al movimiento caótico de sus partículas que la lleva a ocupar todo el volumen disponible. Cuando las moléculas o las partículas de un soluto están disueltas en un solvente, también están en continuo movimiento al azar. Si en una determinada zona hay mayor concentración del soluto, el choque entre las partículas es más frecuente que donde la concentración es menor y se produce un movimiento neto de partículas hacia la zona menos concentrada^[175]. De esta forma, las moléculas del soluto tienden a repartirse homogéneamente en el seno del disolvente, lo cual se alcanza al cabo de cierto tiempo. Así se logra que cada unidad de volumen tenga la misma concentración de soluto, y por tanto se alcance el equilibrio.

La magnitud de la tendencia a difundir desde una zona a otra si está presente una membrana que separe las dos zonas está definida por la ley de difusión de Fick^[180]: el flujo difusivo que atraviesa una superficie (J en $\text{mol cm}^{-2}\text{s}^{-1}$) es directamente proporcional (el coeficiente de proporcionalidad se llama coeficiente de difusión (D), en cm^2s^{-1}) al gradiente de concentración (Δc es la diferencia de concentraciones molares), e inversamente al grosor de la membrana (δ): $J = D \cdot \Delta c / \delta$.

La ósmosis se denomina al proceso de difusión de agua dependiente de un gradiente de concentración, es por tanto el movimiento del agua desde soluciones con baja concentración de soluto hasta soluciones con alta concentración de soluto y la presión osmótica es aquella que debemos ejercer para contrarrestar ese movimiento. Por tanto la presión osmótica es la presión hidrostática que se genera a través de una membrana semipermeable o permeable selectivamente con un gradiente de concentración a lado y lado. Como la presión osmótica producida por un soluto es proporcional a la concentración del mismo en número de moléculas o iones, expresar la concentración del soluto en masa carece de valor para indicar la presión osmótica. Para poder expresar la concentración de soluciones osmóticas según el número de partículas, se utiliza la unidad denominada osmol en lugar de gramo. Luego, un osmol es el número de moléculas contenidas en la molécula gramo de soluto sin disociar^[175].

II.2.3- Osmolaridad.

La presión osmótica depende exclusivamente del número de partículas disueltas (moles) por unidad de volumen, con independencia de su carga eléctrica, peso o fórmula química. Dada la dificultad para medir kilogramos de agua en una solución, cuando se habla de las características osmóticas de los líquidos corporales suele emplearse el término de osmolaridad, que es la concentración osmolar expresada como osmoles por litro de

solución, en lugar de en osmoles por kilogramo de agua (osmolalidad)^[175]. Para una solución al 10% de DMSO, la osmolaridad teórica será la suma de la osmolaridad del plasma (300 mOsm) más la debida a la presencia del crioprotector. Un 10% v/v (volumen 1:1) de DMSO corresponde a una concentración molar de 1,4 moles o 1400 mmol/L (Osmolaridad plasma al 10% v/v DMSO = 1700 mOsm/L).

Esta es la presión osmótica a la que se vería sometida una célula que se encuentra en un medio isotónico al que añadimos en un solo paso un 10% v/v de DMSO. En realidad, la adición del crioprotector a las células a criopreservar se hace paulatinamente durante aproximadamente cinco minutos a 4°C, y a partir de adiciones discretas de una solución 20% v/v DMSO hasta completar una dilución v/v del material a congelar, hasta doblar su volumen. De esta manera y a pesar de los movimientos de agua y solutos a través de la membrana a consecuencia de la presión osmótica generada, se consigue mantener el volumen celular dentro de unos rangos de seguridad que no exceden sus capacidades mecánicas.

II.3- Criopreservación celular.

II.3.1- Conceptos generales.

II.3.1.1- Congelación.

El objetivo principal de la criopreservación de PH es mantener la viabilidad y funcionalidad de los productos celulares a bajas temperaturas durante periodos cortos de tiempo (SP, MO) o incluso durante décadas (SCU). Los productos criopreservados se almacenan a -196°C (N₂ líquido). A esta temperatura no existen fenómenos de difusión ni energía térmica suficiente para llevar a cabo las reacciones químicas y por tanto las dificultades de la congelación no derivan de la permanencia a temperaturas bajas sino de los procesos de congelación y descongelación^[181].

Durante el proceso de congelación se producen diversos cambios fisicoquímicos en el espacio extracelular y las células responden a éstos actuando como osmómetros (se hidratan y deshidratan).

El hielo se forma preferentemente en la solución extracelular que, simplificando, está formada de agua y solutos. Al producirse la cristalización, las moléculas de agua se incorporan al hielo mientras que el soluto queda excluido de la fase sólida. De esta manera, el espacio extracelular que se va concentrando progresivamente (se va haciendo cada vez más hipertónico) a la vez que el potencial perturba el equilibrio termodinámico entre los espacios intra y extracelular y, produce una salida de agua de la células que intenta revertir el desequilibrio. En consecuencia, la célula se deshidrata progresivamente a medida que el espacio extracelular se va concentrando y al mismo tiempo que el agua que exporta la célula se congela en el exterior (fig. 9.1-9.4)^[182;183].

II.3.1.2- Descongelación^[181].

Durante la descongelación se reproducen los cambios osmóticos inversos a los descritos para la congelación. Así, cuando el agua congelada cambia de estado (sólido a líquido), la concentración de solutos en el medio extracelular se reduce progresivamente y la célula vuelve a hidratarse para compensar esta diferencia de concentraciones entre el exterior y el interior celular (fig. 10.1-10.2). La toxicidad del crioprotector y las condiciones de osmolaridad elevada determinaran en este momento la supervivencia celular dependiendo, básicamente, del tiempo de exposición a estas condiciones y de la temperatura.

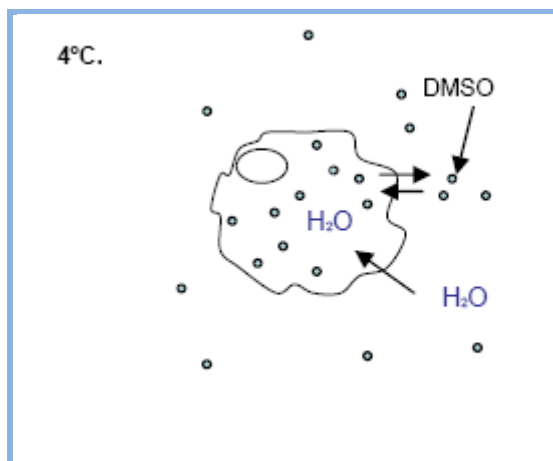


Fig. 9.1. Adición del crioprotector y equilibrio entre el exterior y el interior celular.

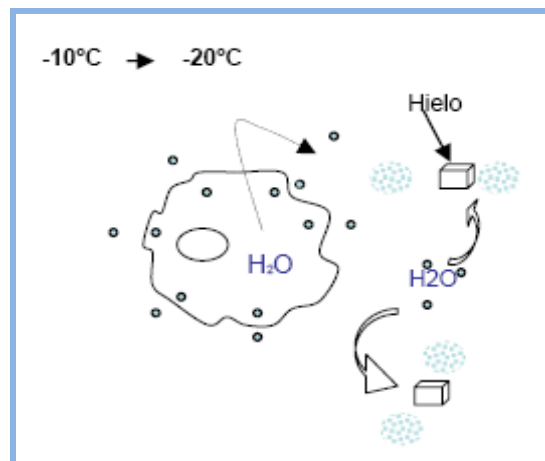


Fig. 9.3. Nucleación, formación de hielo y aumento de la osmolaridad extracelular.

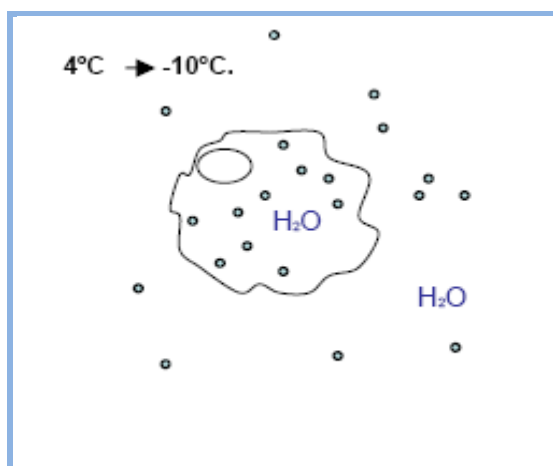


Fig. 9.2. Sobreenfriamiento de la suspensión celular.

(Modificadas de Rodríguez L: "Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados: control de calidad, estabilidad osmótica y lavado de DMSO", Universitat Autònoma Barcelona, 2005, p 23).

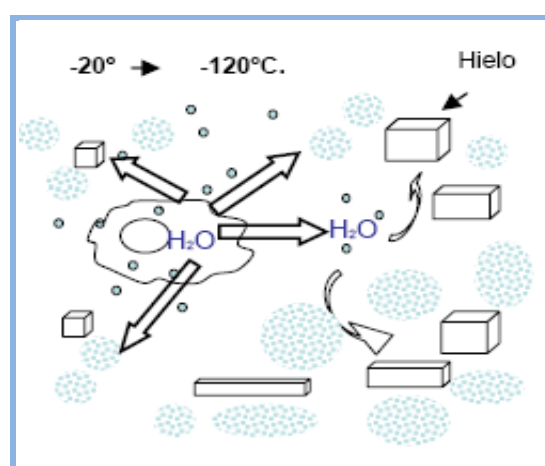


Fig. 9.4. Deshidratación celular en respuesta a la congelación.

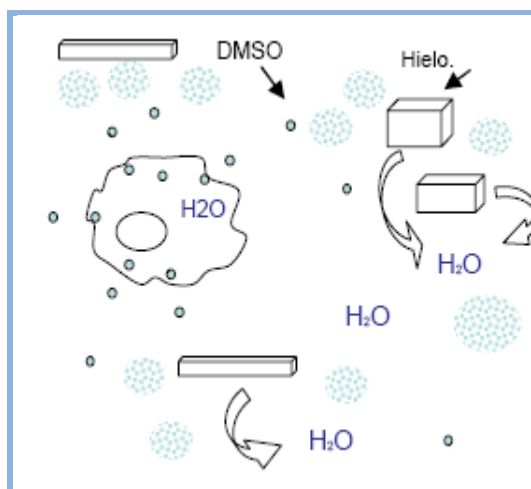


Fig. 10.1. Descongelación y disminución de la osmolaridad extracelular.

(Modificadas de Rodríguez L: "Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados: control de calidad, estabilidad osmótica y lavado de DMSO", Universitat Autònoma Barcelona, 2005, p 25).

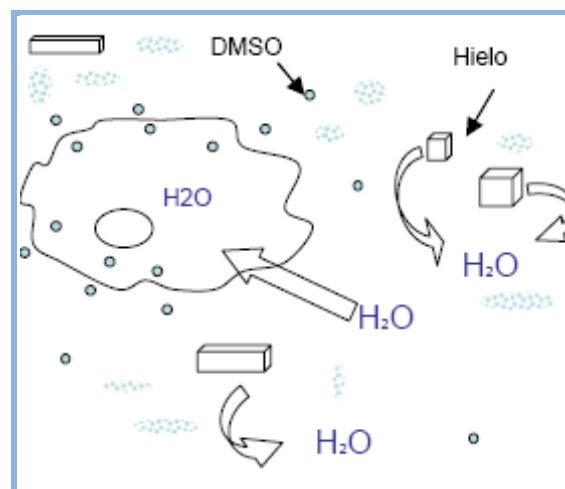


Fig. 10.2. Entrada de agua a la célula en el proceso de descongelación.

II.3.2- Lesiones crioaducidas.

Existen diferentes teorías sobre los mecanismos de daño celular durante la congelación de células vivas. Los más evidentes y demostrados empíricamente son aquellos producidos por la formación de hielo y los relacionados con la deshidratación celular (estrés osmótico) que tiene lugar durante el proceso de congelación^[184].

II.3.2.1- Formación de hielo.

La existencia de solutos en el agua produce un descenso del punto de congelación (descenso crioscópico) y en consecuencia, la cristalización del agua se produce a temperaturas menores a la del punto de congelación del agua pura. Este fenómeno produce, al disminuir la temperatura, un sobreenfriamiento de la muestra^[185]. En una solución sobreenfriada la formación de hielo depende de la probabilidad de formación de un punto de nucleación, punto de inicio de un frente de cristales de hielo, que es inversamente proporcional a la temperatura. La nucleación se puede dar al azar (nucleación homogénea) o mediante una inducción externa (nucleación heterogénea)^[186].

Así, el hielo se forma a partir de un punto de nucleación donde se inicia la transición de fase (hielo-agua) y al que se van añadiendo moléculas de agua que hacen crecer el cristal de hielo. El crecimiento de cristales de hielo durante el descenso de temperaturas podría ejercer un daño mecánico sobre las membranas celulares causando lesiones irreversibles que conducirían a la muerte celular. Los cristales de hielo se pueden formar en el exterior y en el interior celular (es más difícil su formación por el menor número de moléculas de agua libre y el efecto protector de la membrana)^[10].

II.3.2.1.1- Hielo extracelular.

La formación de los cristales extracelulares va incorporando moléculas de agua y liberando los solutos, con lo que la osmolaridad aumenta progresivamente^[10]. Se ha demostrado que la formación de hielo extracelular no es causa de lesión porque las células criopreservadas se mantienen en canales de solución no congelada mientras crecen los cristales de hielo en la solución extracelular superenfriada. Cuando la temperatura del medio alcanza los -130°C , el agua no existe en estado líquido y los canales donde se encuentran las células se encuentran en un estado vítreo (con una alta viscosidad, 10^{13} poises) y sin cristalización, un estado en el que los fenómenos de difusión de las reacciones bioquímicas no son posibles^[187].

En el proceso de congelación de material biológico, por encima de los -5°C , las células y el líquido extracelular se mantienen sin congelar (sobreenfriados), entre los -5°C y los -10°C tiene lugar la formación de hielo en el espacio extracelular pero no dentro de la célula posiblemente por la barrera física que impone la membrana celular al proceso de nucleación y al crecimiento de los cristales de hielo. Asimismo, la probabilidad de iniciar la nucleación en el medio intracelular es mucho menor que en el medio extracelular ya que la nucleación (primer evento para la formación de hielo) está directamente relacionada con el tamaño del compartimento a congelar^[188].

II.3.2.1.2- Hielo intracelular.

En el momento en el que se inicia la nucleación y posterior crecimiento de los cristales de hielo en el espacio extracelular ($<-10^{\circ}\text{C}$), se produce una disminución de la proporción de agua extracelular en estado líquido que provoca una salida neta de agua intracelular para equilibrar el potencial químico del agua a lado y lado de la

membrana (deshidratación celular). En este momento, lo que suceda en el espacio intracelular depende básicamente de la velocidad de enfriamiento^[188;189].

Si la velocidad con que desciende la temperatura es muy rápida, es posible evitar la salida de agua de la célula, pero a costa de que aumente la probabilidad de formación de núcleos heterogéneos y cristales de hielo intracelulares, que pueden contribuir a la destrucción celular mecánica^[185]. La célula puede no ser capaz de deshidratarse suficientemente rápido y al llegar a la temperatura de nucleación, el agua remanente se congela formando hielo intracelular (fig. 11). Este alcanzará un tamaño mayor o menor dependiendo de la velocidad de enfriamiento. En general, cuanto más rápida es la congelación más pequeños serán los cristales.

Si por el contrario la velocidad de enfriamiento es demasiado lenta, este efecto puede conducir a la muerte celular por mecanismos no totalmente esclarecidos, pero en los que la deshidratación y la reducción del tamaño celular tienen un papel importante^[190;191]. Con una velocidad de enfriamiento adecuada, la célula se deshidratará y concentrará intracelularmente antes de alcanzar la temperatura de nucleación, de forma que la posibilidad de congelación intracelular y consecuentemente de daño celular se minimizará^[192].

En general, la supervivencia celular a la congelación será máxima a una velocidad de enfriamiento óptima, que es específica para cada tipo celular. A velocidades mayores o menores a la óptima, la muerte celular aumenta y las causas serán la formación de hielo intracelular y el daño osmótico resultante de la concentración de solutos (fig. 12). Si es posible alcanzar temperaturas en torno a los 40°C bajo cero, el riesgo para la célula disminuye. Esta es la temperatura eutéctica de este sistema, a la cual se produce la nucleación homogénea o vitrificación, con formación de cristales amorfos, sin estructura cristalina, que no dañan las estructuras celulares^[186].

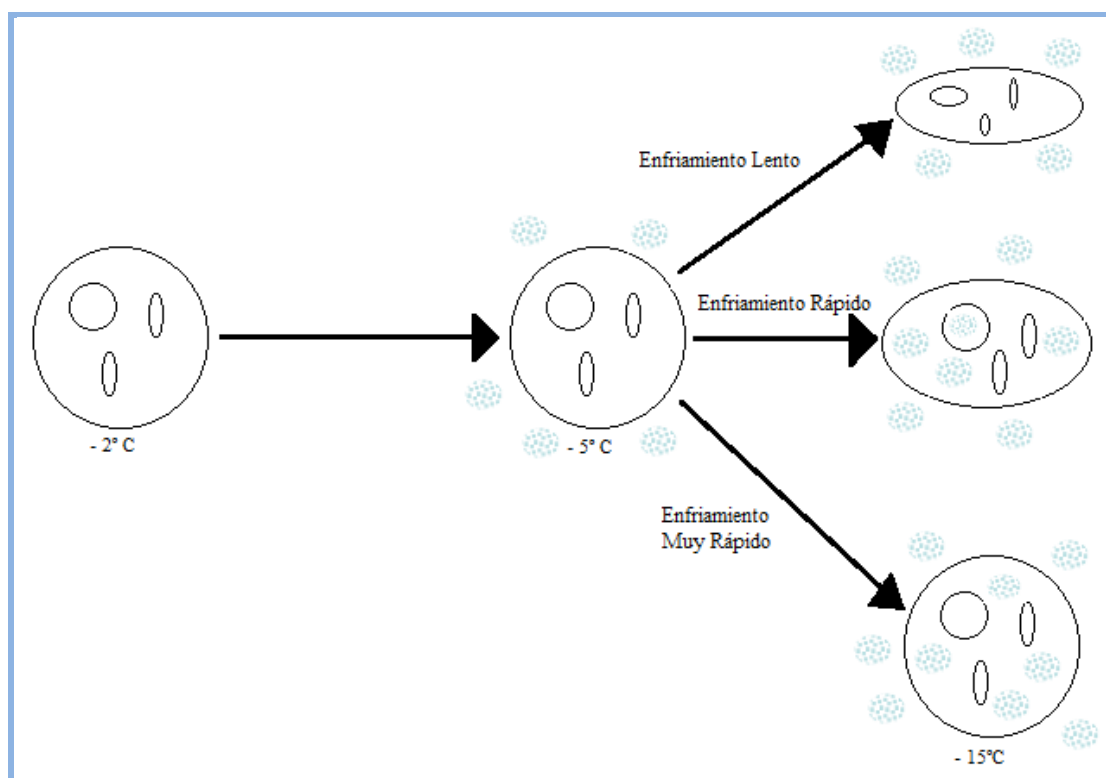


Fig. 11. Efecto de la velocidad de congelación en la formación de hielo intracelular. (Modificado de Rodríguez L: "Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados: control de calidad, estabilidad osmótica y lavado de DMSO", Universitat Autònoma Barcelona, 2005, p 30).

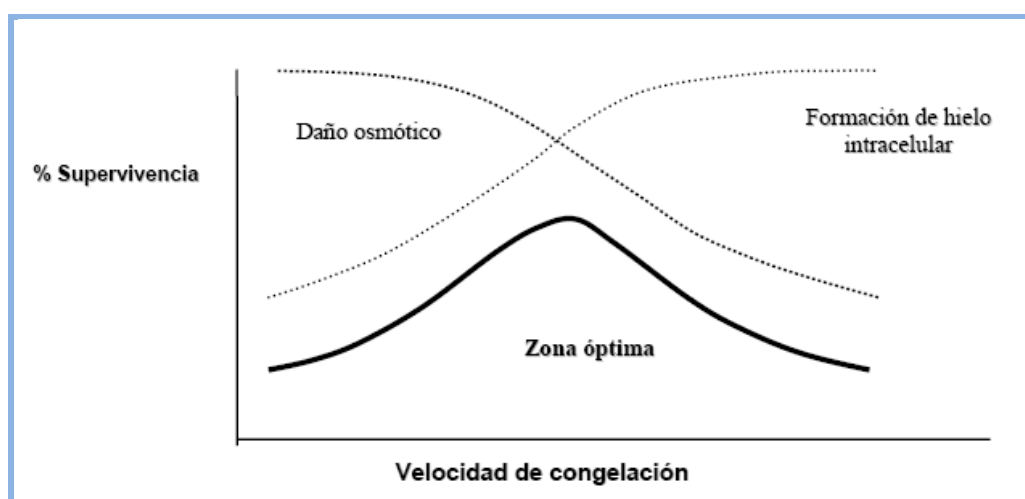


Fig. 12. Naturaleza de los daños criointroducidos según la velocidad de congelación. (Tomado de Rodríguez L: "Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados: control de calidad, estabilidad osmótica y lavado de DMSO", Universitat Autònoma Barcelona, 2005, p 31).

II.3.2.2- Estrés osmótico.

De acuerdo a Mazur^[192] (uno de los pioneros de la criobiología), los periodos críticos para la supervivencia celular durante la criopreservación son la fase inicial del enfriamiento y el periodo de retorno a condiciones fisiológicas. Si bien una velocidad de enfriamiento adecuada es necesaria para evitar la congelación intracelular, *per sé* no garantiza la supervivencia celular. Mazur^[192], postula que la lesión celular crioinducida podría explicarse en función de la formación de hielo intracelular (consecuencia de una velocidad de enfriamiento inadecuada) y el estrés osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares durante la congelación a consecuencia de la formación de hielo y al retornar a las condiciones fisiológicas de osmolaridad.

Existen básicamente dos teorías para explicar el fenómeno de estrés osmótico durante la criopreservación; la de Lovelock^[193] y la de Merymann^[194], son complementarias y aunque los resultados experimentales las avalan, los mecanismos celulares exactos no se conocen.

En 1953 Lovelock publica un trabajo con eritrocitos humanos a los que se expone a diferentes soluciones hipertónicas para simular el efecto de la congelación y demuestra empíricamente que la concentración de solutos produce *per sé* un efecto deletéreo sobre las células. Los mecanismos propuestos a este respecto son las interacciones del soluto iónico con las proteínas que producirían la desnaturalización de proteínas de membrana y/o facilitarían la formación de puentes disulfuro entre aminoácidos^[195].

Alternativamente, Merymann (1971)^[194] propone la hipótesis del volumen celular mínimo que relaciona el efecto de la deshidratación producida durante la concentración de solutos (congelación) y la muerte celular (lisis) con la vuelta a las condiciones isotónicas después de la descongelación (choque osmótico)^[184]. La hipótesis se basa en

la observación de que, aunque algunas células presentan alteraciones en la membrana dependiendo de la concentración de solutos y del tiempo de exposición a las condiciones hipertónicas, la lisis celular se produce al retornar a condiciones isotónicas debido a que la hipertonicidad intracelular produce una entrada masiva de agua que conduce a la lisis osmótica (choque osmótico).

La hipótesis del "volumen celular mínimo"^[196] explica los mecanismos de daño celular producido por la concentración de sales durante la congelación y se basa en que el volumen celular se reduce a medida que aumenta la osmolaridad extracelular (formación de hielo). A medida que la célula pierde volumen la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen (pérdida de agua), en consecuencia, la progresiva incapacidad de la célula a responder a los cambios osmóticos externos produce una presión hidrostática a través de la membrana citoplasmática que llegado a un punto (volumen celular mínimo) excederá la resistencia física de la membrana y producirá cambios irreversibles en su permeabilidad.

II.3.2.3- Parámetros biofísicos.

El volumen osmóticamente inactivo de una célula define el agua que nunca dejará el interior celular en respuesta a un aumento de concentración de solutos en el espacio extracelular por estar asociado a las macromoléculas y estructuras intracelulares, este volumen está relacionado con la hipótesis de volumen mínimo de Merymann. Para las células CD34+ de SCU se ha definido en un 0,2-0,36 del volumen de la célula en condiciones isotónicas^[197]. Por tanto, si la deshidratación celular llega al volumen osmóticamente inactivo, aproximadamente el 60% del volumen celular en condiciones isotónicas, se somete a la célula a un estrés osmótico que puede comprometer su viabilidad.

II.3.3- Concentración celular durante la congelación de progenitores hematopoyéticos.

La concentración celular utilizada en la mayoría de protocolos de criopreservación proviene de la aplicación práctica de consideraciones como congelar más de una bolsa de aféresis o minimizar el volumen total a congelar para optimizar el espacio destinado al almacenamiento^[150]. El paradigma de este hecho es la sangre de cordón umbilical para la que se han desarrollado protocolos de separación de eritrocitos y reducción de volumen para congelar volúmenes tan pequeños como de 25 mL asegurando un 90% de recuperación de progenitores hematopoyéticos^[198]. Adicionalmente, aunque algunos laboratorios limitan la concentración de células nucleadas en los productos criopreservados otros definen la cantidad máxima de eritrocitos, granulocitos o plaquetas a congelar.

Teóricamente, la congelación de células a altas concentraciones puede resultar en bajas recuperaciones postdescongelación a causa del limitado espacio en los canales de solución no congelada que existen entre los frentes de hielo formados durante la congelación y la presión física de las células en estos canales debida al empaquetamiento.

Por esta razón desde la introducción de la sangre periférica como fuente de PH se recomendaron en los productos criopreservados concentraciones de CT menores de $100 \times 10^6/\text{mL}$ ^[160;199]. Posteriormente y con la intención de reducir costos y espacio en los procesos de criopreservación sin comprometer la eficiencia clonogénica, ni la recuperación ni la viabilidad de los PH, se realizaron estudios de funcionalidad postdescongelación y recuperación hematológica postinfusión con aféresis altamente concentradas^[200;201]. En estos trabajos se utilizaron concentraciones de 243×10^6 CT/mL y 370×10^6 CT/mL en los productos congelados y aunque Keung^[200] reportó una pérdida de capacidad clonogénica en los productos descongelados, Rowley^[201] y otros autores^[202] no observaron este fenómeno congelando a concentraciones más altas. Es de destacar que ambos coinciden en

que la recuperación hematológica y la toxicidad postinfusión no se vieron afectadas por la utilización de altas concentraciones en el producto congelado.

II.3.4- Crioprotectores.

Además de una adecuada velocidad de enfriamiento para mejorar la viabilidad celular, es necesario alterar el comportamiento físico-químico de las soluciones acuosas en las cuales tiene lugar la criopreservación, para ello se añaden al medio de congelación agentes crioprotectores (ACP). Los ACP son sustancias muy hidrosolubles que disminuyen el punto eutéctico (temperatura mínima a la que una solución se encuentra en estado líquido) de una solución determinada. El descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que en el momento en el que se induce la nucleación en el espacio extracelular la célula estará más hidratada y el gradiente osmótico al que estará sometida será menor en el momento en que el espacio extracelular se congela^[203].

Los crioprotectores pueden clasificarse en agentes penetrantes y no penetrantes, de acuerdo a la permeabilidad a través de la membrana celular^[203].

a) Los ACP penetrantes son sustancias de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana, que protegen a la célula de las lesiones producidas por las congelaciones a velocidad lenta. Los más utilizados son: 1,2-Propanodiol (PROH), DMSO, Etilen-glicol (EG), Glicerol.

Si bien la célula es permeable a estos agentes su permeabilidad nunca es de la misma magnitud que la del agua.

b) Los ACP no penetrantes son sustancias de alto peso molecular, que son efectivas cuando se utilizan velocidades altas de congelación. No son crioprotectores propiamente dichos, ya que no penetran en la célula sino que ejercen su acción crioprotectora

promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son: Sacarosa, Glucosa, Dextrosa, Polivinil-pirrolidona (PVP), Dextrano, Polietilen-glicol (PEG).

La adición de ACP ejerce *per sé* un estrés osmótico sobre las células porque aumentan la osmolaridad del medio. Las células inicialmente se deshidratan para compensar la fuerza osmótica inducida por la presencia de los ACP y después se hidratan a la vez que el agua vuelve al interior celular junto con el ACP permeable (fig. 13).

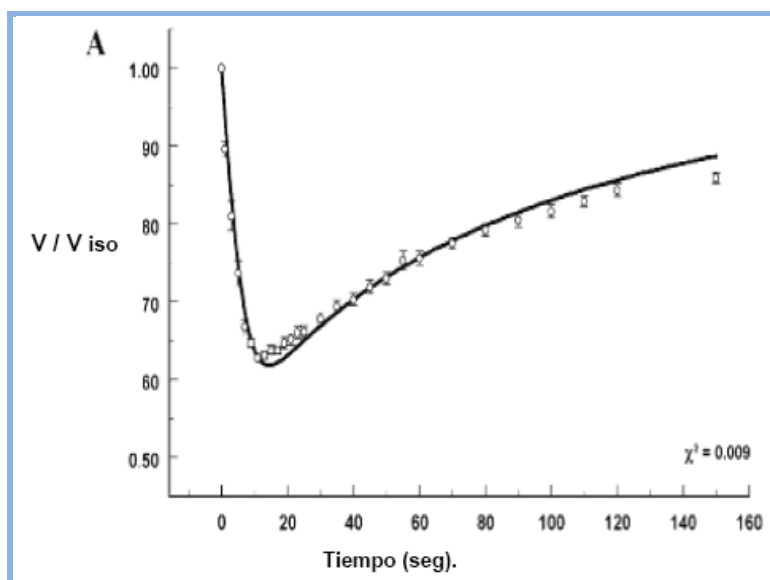


Fig. 13. Variación de volumen de las células CD34+ de SCU en presencia de 10% v/v de DMSO a 22°C. (Tomado de Rodríguez L: "Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados: control de calidad, estabilidad osmótica y lavado de DMSO", Universitat Autònoma Barcelona, 2005, p 34).

II.3.4.1- Dimetilsulfóxido.

El DMSO (C_6H_6SO) es el crioprotector más utilizado en la congelación de PH de cualquier fuente^[204]. El DMSO puro es un líquido incoloro e inodoro con una densidad de 1108 g/cm³ y un peso molecular de 78.13 g/mol. La vida media del DMSO en plasma es de 20 horas aunque el DMSO₂ (sulfato de dimetilo), resultante del metabolismo del DMSO, tiene una vida media de 72 horas y es excretado vía renal^[205].

Una pequeña proporción del DMSO se reduce a sulfuro de dimetilo (DMS) que es excretado a través de la respiración durante 24 horas después de la infusión (origen del olor característico, aliento y piel, que aparece durante la infusión)^[206].

La concentración óptima para la criopreservación de progenitores hematopoyéticos parece ser la de un 10% v/v aunque concentraciones del 5% v/v^[207] y combinaciones con hidroxietilalmidón (5%-6%) también han sido reportadas con buenos resultados postdescongelación^[208]. Finalmente, el DMSO se utiliza como crioprotector acompañado en la mayoría de los casos de una fuente de proteína (albúmina plasmática), autóloga o no, a una concentración final del 2%-5% v/v.

Varias propiedades de este compuesto contribuyen a proteger las células del daño inducido por frío. Por una parte, es un agente coligativo, capaz de ligar moléculas de agua. El DMSO reduce el agua disponible para los cristales, haciendo que permanezca en su sitio manteniendo el equilibrio osmótico. Por otro lado, la viscosidad el DMSO aumenta de forma importante al descender la temperatura, lo que dificulta la formación de una estructura cristalina y favorece la vitrificación. Junto a todo ello, el DMSO es una sustancia extraordinariamente liposoluble, lo que posibilita su rápida difusión al interior de la célula. En contrapartida, este agente tiene un efecto tóxico sobre la célula a temperatura ambiente, por lo que es preciso reducir al mínimo el tiempo de contacto con las células en estas condiciones. La dilución del DMSO libera calor, y su incorporación rápida a la suspensión celular puede producir un daño osmótico.

Para garantizar un descenso de la temperatura homogéneo y progresivo, a un ritmo adecuado (entre 1° y 3°C por minuto hasta alcanzar la temperatura de vitrificación) se utilizan cámaras de criopreservación programada. Estos dispositivos van suministrando el nitrógeno líquido necesario para descender la temperatura de la cámara al ritmo previsto por un programa informático configurable según el tipo celular. En el momento

del cambio de estado el sistema genera un enfriamiento suplementario para compensar la liberación de calor. Una vez superada la temperatura de vitrificación, el descenso se puede producir a un ritmo mayor. La congelación programada según este esquema en presencia de un 10% de DMSO es un procedimiento reproducible y seguro para garantizar la viabilidad de los PH^[209] (fig. 14).

Tras la criopreservación programada, el almacenamiento a temperaturas inferiores a -120°C , ya sea en tanques de nitrógeno líquido o en ultracongeladores mecánicos (fig. 15), permite la conservación de un producto celular útil para el trasplante durante largo tiempo^[210]. Algunos autores han sugerido que simplemente con temperaturas inferiores a -80°C es posible una conservación satisfactoria, al menos a corto plazo^[211].



Fig. 14. Congelador biológico que permite la criopreservación de muestras de forma programada.



Fig. 15. Tanque de nitrógeno líquido, que mantiene -196°C en la fase líquida y entre -140°C y -196°C en la fase de gas para la conservación de los progenitores hematopoyéticos.

En el momento preciso para su infusión es recomendable descongelar rápidamente el producto celular, lo que se suele llevar a cabo en un baño a 37°C en dos o tres minutos. Una descongelación más lenta supone un riesgo de recristalización intracelular, por la coexistencia en la bolsa de zonas parcialmente descongeladas con zonas congeladas aún a temperaturas muy bajas^[186]. Una vez descongelado, la práctica habitual es infundir el producto celular al paciente en el curso de pocos minutos para evitar el efecto tóxico del DMSO a temperatura ambiente sobre las células.

II.3.4.2- Cambios celulares debidos a dimetilsulfóxido tras la descongelación.

Cuando enfrentamos un producto hematopoyético descongelado a una solución isotónica, la gran concentración intracelular de DMSO conducirá una introducción de agua del medio circundante a través de la membrana. En consecuencia, las células se expandirán para igualar la concentración del crioprotector a lado y lado de la membrana al mismo tiempo que el DMSO difundirá hacia el exterior celular que presentará una concentración menor de crioprotector. Como las células descongeladas son infundidas inmediatamente postdescongelación en la mayoría de instituciones, el plasma del paciente será la solución circundante que tendrá una concentración de DMSO igual a cero^[212].

La descongelación del producto hematopoyético criopreservado es el último proceso antes de la infusión en el paciente. Los eventos fisico-químicos y la respuesta celular durante este proceso se han detallado en secciones anteriores (ver II.3.1, II.3.2). Simplemente añadir que este proceso se realiza mediante la inmersión del inóculo hematopoyético en un baño a 37°C aplicando un suave masaje sobre la bolsa hasta que no queda hielo visible. Este proceso de descongelación rápida ($> 100^{\circ}\text{C}/\text{min}$) evita la recristalización del agua, asociación de pequeños cristales de hielo que al unirse pueden

crecer en tiempos cortos y dañar las membranas mecánicamente^[213]. Si se han formado cristales microscópicos durante la congelación y debido a que estos tienen un estado de energía libre mayor que los cristales de más tamaño, al descongelarse tenderán a asociarse entre ellos para obtener un estado energético menor (termodinámicamente favorable) fusionándose y formando cristales de mayor tamaño que pueden perforar la membrana citoplasmática^[214].

II.3.4.3- Toxicidad del dimetilsulfóxido.

Podemos considerar la toxicidad del DMSO a dos niveles; toxicidad sobre las células criopreservadas (toxicidad celular) y toxicidad relacionada con la infusión. Así, debemos diferenciar entre los mecanismos que disminuyen la viabilidad y/o capacidad clonogénica de los progenitores hematopoyéticos en presencia de DMSO y la reacción fisiológica resultante de la infusión de éste.

II.3.4.3.1- Toxicidad química celular.

Los resultados experimentales publicados en referencia a la toxicidad química del DMSO sobre las células son contradictorios. Así, aunque existe una creencia generalizada de que el DMSO es tóxico a temperatura ambiente y no lo es a 4°C, diversos autores reportan resultados a favor y en contra de esta teoría^[215-218].

En 1978 Goldman^[217] publica que la capacidad clonogénica en MO descongelada disminuye en presencia de un 10% de DMSO y que ésta puede ser prevenida con una dilución 1/2 v/v en salino, sugiriendo que el choque osmótico tras una dilución brusca de los PH descongelados y la hiperosmolaridad son los factores responsables de este fenómeno. En 1982 Douay^[216] reporta la pérdida de un 15% de la capacidad clonogénica en MO descongelada y la atribuye a la toxicidad química del DMSO a

4°C, sin embargo, estudios más recientes muestran como concentraciones de DMSO del 8%-10% tienen poco o ningún efecto sobre la capacidad clonogénica de los PH de MO y SP. Así, Rowley en 1993^[218] publica que la exposición de una hora de PH de MO y SP al DMSO (8-10%) no afecta a la capacidad clonogénica. Adicionalmente, en 1994 Branch^[215], reporta que la exposición de PH de MO descongelada a un 8% de DMSO durante dos horas no tiene efecto significativo en la recuperación de colonias.

Rodriguez y col.^[13] demostraron que la presencia de DMSO en productos hematopoyéticos es deletérea para la conservación de los injertos descongelados, pues tras dos horas postdescongelación, a pesar de estar conservados a 4°C, existe una disminución del recuento de células CD34+ vivas en un 50% y la recuperación clonogénica en un 60%.

II.3.4.3.2- Toxicidad asociada a la infusión.

La infusión del DMSO ha sido relacionada directamente con diversas reacciones adversas durante la infusión y está aceptado que éstas son dependientes de la dosis de crioprotector administrada^[219-221]. Estas complicaciones van desde mareos hasta fallos renales agudos y paradas cardíacas, aunque las complicaciones más frecuentes son las náuseas, el vómito, el dolor abdominal y los escalofríos^[222;223]. Estos síntomas, que no son totalmente prevenidos con la premedicación administrada antes de la infusión, desaparecen después de la infusión.

Otras complicaciones como las variaciones de presión sanguínea, la disnea y la toxicidad cardíaca también se han asociado a la administración del DMSO^[224;225]. En este sentido, Alessandrino^[219] reporta que la incidencia de la hipertensión fue del 36% en un estudio con 75 pacientes sometidos a TPH. Aunque poco frecuentes,

también se han publicado complicaciones neurológicas^[226] en pacientes que han recibido PH criopreservados. Así, se han descrito episodios de amnesia global transitoria en 3 pacientes de una serie de 179 sometidos a TPH, sugiriendo que, aunque inusual, la infusión de DMSO puede dar lugar a isquemias cerebrovasculares severas secundarias a una toxicidad neurológica severa, tal y como se había sugerido anteriormente en trabajos fuera del contexto del TPH^[227].

Todos estos síntomas coincidieron con la infusión de los PH criopreservados y parece improbable por tanto que provengan únicamente de la quimioterapia previa a la que se sometieron los pacientes. Por otra parte, aunque se atribuyen al DMSO, la aparición de estas complicaciones puede estar influenciada por otros factores como la infusión de los restos celulares y de citoquinas provenientes de las células muertas o dañadas. En este sentido, las reacciones febriles pueden provenir de la infusión de agregados de glóbulos blancos y, la bradicardia y la hemoglobinuria reportadas tras la infusión de MO pueden estar relacionadas con la contaminación de glóbulos rojos y la consecuente liberación de hemoglobina, electrolitos y restos celulares^[228].

Se ha sugerido que los restos celulares y la baja temperatura de los productos hematopoyéticos infundidos podrían provocar *per sé* respuestas vagales, alteraciones electrolíticas locales y expansiones de volumen que estarían asociadas a un ritmo cardíaco ralentizado y que por tanto podrían dar origen a las complicaciones cardiovasculares observadas durante la infusión de los PH descongelados^[225;229]. Adicionalmente, la premedicación antihistamínica para prevenir la liberación de histamina inducida por el DMSO podría causar por sí misma bradicardia. Por tanto, la patogénesis de muchas de las complicaciones observadas durante la infusión de PH descongelados puede ser multifactorial.

II.3.5- Respuesta osmótica de los progenitores hematopoyéticos al lavado post-descongelación.

Para reducir y/o evitar la toxicidad asociada al TPH se han propuesto diversas aproximaciones; la criopreservación a altas concentraciones de células nucleadas^[202], el uso de menos DMSO en las soluciones de criopreservación^[230;231], la mezcla de crioprotectores^[232], el fraccionamiento de las infusiones^[233] y la selección de células progenitoras para reducir el volumen de producto criopreservado^[234]. Sin embargo, todas estas técnicas resultan en una reducción limitada de crioprotector y de los restos celulares y moléculas resultantes de la lisis celular postdescongelación.

Alternativamente, se ha propuesto la eliminación del DMSO antes de la infusión mediante técnicas de centrifugación y extracción de volumen sobrenadante tanto manual^[235;236] como semiautomática^[237]. En estas técnicas el sobrenadante que contiene parte del DMSO es descartado tras la centrifugación y el "pellet" que contiene las células es resuspendido en un medio isotónico antes de la infusión. Los resultados reportados al respecto son variables y casi siempre resultan en poca eliminación del DMSO y nada o casi nada de reducción de los restos o detritus celulares. Además, estas técnicas pueden dar lugar a una pérdida sustancial de progenitores comprometiendo la probabilidad de injerto y por tanto deben considerarse con cautela. Existe experiencia en la utilización de sistemas automáticos de lavado sobre todo en unidades de SCU, siendo efectivos tanto desde el punto de vista de recuperación celular y colonias clonogénicas como de seguridad microbiológica; además la eliminación de DMSO con estos sistemas llegan a un 98% y el producto resultante muestra una osmolaridad similar a la del plasma, lo que prevendría un posible choque osmótico durante la infusión del producto descongelado^[238].

Por tanto, el uso de sistemas automáticos de lavado celular postdescongelación que aseguren una recuperación celular aceptable, que produzcan resultados reproducibles y

funcionen en sistemas cerrados podría ser de gran utilidad para aminorar los efectos de la infusión directa de productos hematopoyéticos descongelados. De hecho existen publicaciones con la utilización de sistemas automáticos con sistemas cerrados para el lavado de PH obtenidos de sangre periférica tras su descongelación mediante el procesador Cytomate[®] (Baxter Oncology, Chicago, IL), y de PH de SCU con procesador Sepax[®] S-100 (Biosafe, Eysins, Switzerland), documentando que se trata de un procedimiento eficaz desde el punto de vista de viabilidad celular y recuperación de PH tras los lavados, además de ser seguro y más rápido en el ámbito de laboratorio de investigación^[238;239].

HIPÓTESIS y OBJETIVOS

La capacidad terapéutica del trasplante autólogo de PH reside en la administración de altas dosis de quimioterapia -en ocasiones asociada a radioterapia- durante el tratamiento de acondicionamiento. El trasplante celular permite que sea viable esta estrategia, pero no elimina completamente la toxicidad hematopoyética y extrahematopoyética que conlleva un tratamiento de tal magnitud y que en último término condiciona sus resultados finales. Sin duda, la toxicidad del trasplante es un factor clave en la estimación del balance riesgo/beneficio a la hora de tomar una decisión clínica sobre la indicación del procedimiento. La aplasia medular que sigue al acondicionamiento es la principal causa de morbi-mortalidad en la fase precoz del trasplante, pero hemos visto como otros factores contribuyen de manera directa o indirecta a la toxicidad relacionada con el trasplante en este periodo. Entre ellos, cabe destacar los efectos adversos derivados de la infusión del DMSO de los productos criopreservados, así como de los restos celulares y de citoquinas provenientes de las células muertas o dañadas.

La aplasia postrasplante es de duración variable y tiene relación directa con la aparición del injerto hematopoyético. Existen múltiples variables relacionadas con los pacientes y con el procedimiento del trasplante que tienen influencia sobre la recuperación hematopoyética, como el tipo de enfermedad de base, el grado de daño medular ocasionado por la enfermedad y por los tratamientos recibidos, el tipo de acondicionamiento, y sobre todo, la dosis de progenitores trasplantados.

Una maniobra que podría disminuir la morbilidad del trasplante en la fase de infusión de los PHSP previamente criopreservados, es la eliminación del crioprotector (DMSO) tras la descongelación mediante un método de lavado que no afecte a la eficacia y seguridad del inóculo.

La hipótesis de este trabajo es que la eliminación del DMSO contenido en las bolsas criopreservadas de PHSP mediante un sistema automático cerrado disminuirá la aparición de efectos secundarios relacionados con la infusión de DMSO, sin que ello suponga un mayor riesgo de contaminación bacteriana ni diferencias en el tiempo hasta el injerto hematopoyético.

En base a esta hipótesis, nos propusimos investigar la eficacia y seguridad de un nuevo método de lavado de PHSP para eliminar el DMSO del producto celular descongelado antes del trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TASPE). Los objetivos principales y específicos de esta tesis doctoral son los siguientes:

1- Estudiar la eficacia del procedimiento de lavado del DMSO de los PHSP criopreservados, antes de su infusión, mediante un sistema automático y cerrado. Los objetivos específicos serán:

1.1- Estudiar las características del inóculo:

1.1.1- Desde el punto de cuantitativo, con la determinación de CT y de células CD34+.

1.1.2- Desde el punto de vista funcional, con el recuento de colonias granulomacrofágicas, eritroides y megacariocíticas.

1.2- Estudiar las características del injerto hematopoyético:

1.2.1- Tiempos de injerto leucocitario y plaquetar.

1.2.2- Requerimientos transfusionales.

2- Estudiar la seguridad del procedimiento de lavado del DMSO de los PHSP criopreservados, antes de su infusión, mediante un sistema automático cerrado. Los objetivos específicos serán:

2.1- Estudiar la tasa de contaminación bacteriana durante el proceso.

2.2- Estudiar las reacciones adversas durante la infusión de PHSP secundarias a la toxicidad derivada del DMSO.

MATERIAL y MÉTODOS

I. Pacientes.

En este trabajo estudiamos a 128 pacientes sometidos a altas dosis de quimioterapia (ADQT) y TPH autólogo entre septiembre del 2008 y diciembre del 2010, en el programa de trasplantes del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA). Las indicaciones para el TASPE, realizadas por los responsables clínicos de la Unidad de Oncohematología infantil y del Servicio de Hematología y Hemoterapia, incluyeron hemopatías malignas, neoplasias sólidas y enfermedades autoinmunes, según los protocolos de la unidad de TPH y del grupo español de trasplante hematopoyético (GETH) y del grupo europeo de trasplante de médula ósea (EBMT).

De forma prospectiva estudiamos 64 pacientes a los que se infundió un producto celular de PHSP lavados con un nuevo sistema automatizado y cerrado para la depleción de DMSO, que se compararon con un grupo control histórico de 64 pacientes sometidos a TASPE, con características clínicas similares.

En todos los casos se obtuvieron los consentimientos informados correspondientes para todos los procedimientos según los requisitos del Comité de ética y ensayos clínicos del HCUVA. La información acerca de la movilización y recolección de PH fue facilitada directamente por los hematólogos responsables de estas actividades.

Antes del trasplante cada paciente fue sometido a una evaluación completa del estatus de su enfermedad y su estado general, según los protocolos rutinarios de actuación de la unidad de TPH. Estas evaluaciones incluyeron hemograma, pruebas de coagulación, bioquímica general, proteinograma (con inmunolectroforesis y cuantificación de la banda monoclonal en su caso), inmunoglobulinas, sistemático de orina y sedimento (con cuantificación e inmunolectroforesis de proteínas y excreción de cadenas ligeras en 24 horas en su caso), aclaramiento de creatinina, tomografía computarizada (TC) cervico-toraco-abdomino-pélvico y/o tomografía por emisión de positrones (PET), gammagrafía ósea (en tumores sólidos), serie ósea metastásica (gammapatías

monoclonales), espirometría, test de difusión de CO, ecocardiograma con medición de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y aspirado con o sin biopsia de médula ósea.

II. Movilización.

Para la movilización se utilizó un régimen homogéneo en todos los pacientes, basado en una modificación del propuesto por Sheridan y col.^[240] Tras la recuperación de la hematopoyesis, al menos un mes después del último ciclo de quimioterapia, en todos los pacientes se administró G-CSF recombinante (filgrastim; Neupogen[®], Amgen Europe B.V., ZK Breda, Países Bajos) a una dosis de 5 mcg/Kg/12 horas por vía subcutánea desde 4 días antes de la primera leucoaféresis (al menos 9 dosis de G-CSF), hasta el día de la última leucoaféresis. Todo el procedimiento de movilización y recolección se llevó a cabo de forma ambulatoria, salvo en pacientes que debieran permanecer ingresados por otras causas.

Para aquellos casos en que tras una movilización no fuera posible recolectar un número suficiente de PH para el trasplante se planificó una segunda movilización: similar a la primera sólo con filgrastim o utilizando doble dosis de filgrastim o utilización quimioterapia previamente al filgrastim. En estos casos el total del producto infundido en el trasplante fue el que se consideró para el análisis del injerto.

III. Recolección celular.

Antes de comenzar el proceso de aféresis si el paciente no era portador de un catéter venoso central de alto flujo tipo Hickman, se colocó uno tipo Shaldon. La colocación del catéter se realizó en una unidad de radiología vascular intervencionista, en la unidad de cuidados intensivos o por parte del Servicio de Cirugía Infantil en el caso de pacientes pediátricos.

La recolección celular se inició el quinto día desde el comienzo de la movilización o en el día establecido tras la administración de quimioterapia movilizadora, realizando una sesión diaria de leucoaféresis hasta recolectar un número suficiente de PH para el trasplante o bien hasta tener

constancia de que la movilización se encontrara en fase regresiva y la cifra de PH en sangre periférica no aconsejaba realizar más por el bajo rendimiento previsible ($CD34+ \leq 10/\text{mL}$). El número mínimo de leucoaféresis programadas por movilización fue de una.

El criterio para considerar un producto como suficiente e interrumpir las recolecciones fue alcanzar una cantidad mínima de $2 \times 10^6/\text{Kg}$ células $CD34+$ medidas por citometría de flujo.

Las leucoaféresis se llevaron a cabo en procesadores celulares de flujo continuo, procesando cuatro veces el volumen sanguíneo calculado^[241] del paciente por sesión (fig. 16).

$$VS = 0.3669A^3 + 0.03219P + 0.6041$$

Fig. 16. Fórmula volumen sanguíneo. **VS**= volumen sanguíneo en litros. **A**= altura en metros. **P**= peso en kilogramos. (Tomado de Nadler y col: "Prediction of blood volume in normal human adults". Surgery 1962).

Como anticoagulante se utilizó citrato de dextrosa fórmula A (ACD-A, Baxter, Deerfield, IL., USA) junto con heparina sódica (Laboratorios Rovi S.A., Madrid, España) a razón de 10U por cada mililitro de ACD-A. A lo largo del estudio se utilizaron dos procesadores celulares, el Fenwall CS-3000 plus[®] (Baxter, Deerfield, IL, USA) y Cobe[®] Spectra (Gambro BCT, Lakewood, CO, USA). El procesador CS-3000 plus[®] se utilizó con flujo de entrada entre 30-40 mL/min en pacientes pediátricos y 60-80 mL/min en adultos (fig. 17). En el procesador Cobe[®] Spectra se utilizó con la versión 5.1 de software con el programa convencional de recolección de CMN, y una proporción de anticoagulante entre 1:24 (fig. 18).

En el momento de la aféresis se extrajo una muestra de sangre para los recuentos de CT, CMN y determinación de células $CD34+$, y a la mitad del procedimiento de aféresis se recogió una muestra de 30 mL con la jeringa de 1 mL de la bolsa de recolección para comprobar el número de células $CD34+$ obtenidas, y estimar la volemia que sería necesario procesar finalmente para la obtención de la celularidad programada para la realización del trasplante autólogo.



Fig. 17. Procesador celular CS-3000 plus®.



Fig. 18. Procesador celular Cobe® Spectra.

IV. Caracterización, procesamiento, criopreservación y conservación celular.

Como se ha comentado en el apartado anterior, antes, durante y después de la recolección se realizó un recuento y caracterización de los PH, con las técnicas que se especifican más adelante en este apartado.

Los productos celulares de aféresis fueron procesados y criopreservados inmediatamente en la mayor parte de los casos. Cuando no fue posible procesarlos inmediatamente se almacenaron a 4° C y fueron criopreservados al día siguiente, antes de cumplirse 24 horas de su obtención con una mediana de 17 horas (14-19 horas).

Para la criopreservación, se añadió al producto de la leucoaféresis una mezcla crioprotectora para conseguir una concentración celular final inferior a 150×10^9 células/L y una concentración final de DMSO del 10% (fig. 19). La mezcla crioprotectora se preparó con DMSO y plasma autólogo o heterólogo isogrupo y se añadió lentamente y con agitación suave al producto celular

manteniendo las bolsas refrigeradas sobre bloques acumuladores de frío. El producto de la aféresis se repartió en caso de ser necesario en varias bolsas de criopreservación (Cryocyte[®], Baxter Healthcare Corporation, Immunotherapy Division, Deerfield, IL., USA) para no exceder un volumen final por bolsa de 160 mL.

Se realizaron controles de calidad antes de la mezcla con plasma y DMSO, para conteo celular, determinación de CD34+, y cultivos de colonias; y tras la adición de la mezcla criopreservadora para estudio de la viabilidad y control microbiológico.

$$\text{Volumen bolsa aféresis (mL)} \times n^{\circ} \text{ CT bolsa aféresis (x10}^6\text{/L)} / 150 \text{ (x10}^6\text{/L)} = \text{Volumen final (mL)}$$

Fig. 19. Fórmula para el cálculo del volumen final. **mL**: mililitros. **n°**: número. **CT**: células totales. **L**: litros.

Finalmente, los productos celulares con la mezcla crioprotectora se sometieron a criopreservación programada mediante un congelador biológico CM-2000 (Carburos Metálicos, Barcelona, España). Estos congeladores enfrían las muestras según unas curvas programadas de congelación; la transmisión de temperatura entre la cámara interior y las muestras a criopreservar se maximiza mediante el uso de placas metálicas que cubren las muestras dentro del congelador manteniendo un grosor homogéneo. Las curvas programadas de congelación se componen de segmentos, cada uno de los cuales tiene una velocidad de enfriamiento (1-2°C/min) determinada empíricamente para obtener una máxima viabilidad tras el proceso de congelación.

Una vez alcanzada la temperatura de -120 °C se retira las bolsas del congelador biológico y se introducen para su almacenamiento en la fase líquida de un tanque de nitrógeno a -196°C.

IV.1- Recuentos celulares.

La cuantificación de CT en los productos celulares se llevó a cabo mediante contadores celulares automáticos. Las muestras procesadas se tomaron de la bolsa de recolección de

aféresis; del producto final tras la mezcla con plasma y DMSO; del producto de PHSP tras su descongelación y del producto de PHSP tras ser sometidos a la depleción del DMSO (sólo en el caso de los pacientes de este grupo). De cada muestra se realizó un recuento con el contador Sysmex[®] KX-21N (Roche Diagnostics S.L., San Cugat del Valles, Barcelona, España). Todas las muestras se diluyeron hasta una proporción de 1:10 con suero salino antes de los recuentos automáticos para evitar el error de conteo por exceso de concentración celular (mayor de $100 \times 10^9/L$). Para el análisis estadístico se han tenido en cuenta los recuentos de la muestra pre-criopreservación y post-lavado (en los casos con depleción del DMSO) proporcionados por el contador. La variable estudiada, como se indica más adelante, es el número de CT por Kg de peso del paciente. La fórmula utilizada para hallar este dato es la siguiente: Leucocitos $\times 10^9/L$ en muestra diluida al 1:10 $\times$ Volumen de la bolsa en mL $\times 10$ / Peso en Kg.

El contador Sysmex[®] KX-21N (fig. 20) calcula el recuento de los leucocitos, hematíes y plaquetas por el método directo de detección de corriente con la corrección de coincidencia.



Fig. 20. Contador celular automático Sysmex[®] KX-21N.

La discriminación automática en la separación de las poblaciones se basa en algoritmos complejos. La intensidad del pulso electrónico de cada célula analizada es proporcional al volumen de la célula.

IV.2- Cultivos de unidades formadoras de colonias granulomacrofágicas.

Los cultivos clonogénicos para colonias granulomacrofágicas y eritroides se realizaron en un medio de cultivo enriquecido semisólido (Methocult[®] H4434; Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) y para colonias megacariocíticas utilizando un medio semisólido con trombopoyetina (MegaCult-C[®], Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá). Se sembraron 2×10^4 células por placa, utilizándose 2 placas por muestra. Las placas así sembradas se cultivaron durante 14 días en una estufa a 37°C con 5% de CO₂ y en ambiente saturado de humedad. Al cabo de este tiempo, las placas fueron examinadas en fresco mediante un invertoscopio: se contaron el número de colonias por placa calculando la media de éstas para el posterior cálculo del número total de colonias (fig. 21). Los resultados se expresaron como número de unidades formadoras de colonias $\times 10^4$ por Kg de peso del paciente.

$$\text{nº colonias totales} = \text{media nº colonias en 2 placas} \times \text{nº células totales} / 20000$$

Fig. 21. Fórmula para el cálculo del número (nº) de colonias totales.

IV.3- Viabilidad celular.

La viabilidad se determinó con el método de exclusión de azul tripán al 0.2% (Trypan blue, Difco laboratorios, West Molesey, Surrey, UK). El azul de tripán es un colorante utilizado para el recuento de células íntegras por exclusión de dicho colorante. Este método está basado en que las células vivas (viables) no captan el colorante y se ven refringentes mientras que las células muertas (no viables) se tiñen de azul, expresándose la viabilidad como el porcentaje de células viables.

IV.4- Citometría de flujo.

Los granulocitos, monocitos, linfocitos y las células CD34+ en los productos de aféresis, así como en los controles post-descongelación y post-lavado, se midieron mediante citometría de flujo con un citómetro de flujo BD FACSCanto II[®] (Becton-Dickinson, San José, CA., USA). El procedimiento estándar para el marcaje de células se realizó con el anticuerpo monoclonal anti-CD14 para células presentadoras de antígenos (APC) (Inmunostep S.L., Salamanca, España) y el BD[®] Stem Cell Enumeration Kit (Becton-Dickinson, San José, CA., USA) que contiene 50 tubos BD[®] trucount, BD[®] reactivos para PH (anticuerpos monoclonales CD45-FITC/CD34-PE para la identificación de leucocitos y PH), 7-amino-actinomicina D (7-ADD) como colorante de ácidos nucleicos para medir la viabilidad celular y solución de lisis de cloruro de amonio. Para ello en un tubo trucount se puso 10 mL de los anticuerpos anti-CD45-FITC/CD34-PE, 10 mL de 7-ADD y 2,5 mL de anti-CD14 APC; añadimos 50 mL del producto de aféresis y dejamos incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Posteriormente se lisaron con 1 mL de la solución lisante diluido 1/10, se agitaron y se dejaron a temperatura ambiente otros 10 minutos y en la oscuridad. Una vez lisadas se adquirieron a través del citómetro de flujo BD FACSCanto II[®] (fig. 22) recogándose 100.000 eventos y analizándolos con el programa informático utilizando el módulo de software BD[®] SCE para la adquisición (Becton-Dickinson, San José, CA., USA) y con el software BD[®] FACSCanto para el análisis clínico (Becton-Dickinson, San José, CA., USA) siguiendo el protocolo de análisis de la International Society for Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE)^[242].



Fig. 22. Citómetro de flujo BD FACSCanto II®.
(Tomado de <http://www.immunology.utoronto.ca/FlowCytometry/equipment.htm>,
acceso 10/07/12).

IV.5- Cultivos bacteriológicos.

Los cultivos bacteriológicos se realizaron inmediatamente después de la mezcla de los PHSP con el DMSO (muestra pre-criopreservación) y en el momento de la infusión. Para ello se tomó 1 mL de la muestra y se inyectaron en botellas de cultivo de aerobios y anaerobios BacT/ALERT® (Bio-Mérieux, Marcy-l'Etoile, Ródano, Italia), y luego se incubaron y se analizaron para la detección de bacterias de forma diaria durante todos los días durante una semana. Para las muestras positivas en la tinción de Gram se sembraron en diferentes medios de cultivo según este resultado (agar chocolate, agar sangre, SCS, Mc Conkey y agar Saboraud dextrosa) para la identificación de la bacteria y determinar la sensibilidad a diferentes antibióticos.

V. Acondicionamiento.

Una vez comprobado que el paciente cumplía todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión para la realización del trasplante, y que el producto recolectado se consideraba suficiente, se planificaba el tratamiento de acondicionamiento y se procedía al ingreso. Se utilizaron diferentes esquemas de altas dosis de quimioterapia en función de la enfermedad de base²⁷. La tabla 2 resume los regímenes de acondicionamiento utilizados. Como es habitual, se contabiliza como “día cero” el de la infusión del producto celular.

En los pacientes con Linfoma no Hodgkin (agresivos e indolentes) y Linfoma de Hodgkin se utilizó el protocolo BEAM, a base de BCNU o carmustina 300 mg/m^2 iv el día -6, etopósido $200 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ iv del día -5 al -2 (dosis total: 800 mg/m^2), citarabina $200 \text{ mg/m}^2/12$ horas iv los días -5 al -2 (dosis total: 1600 mg/m^2) y melfalán 140 mg/m^2 iv el día -1 o protocolo ICT-Cy, a base de irradiación corporal total $2 \text{ Gy}/12$ horas del día -7 a -5 (dosis total: 12 Gy) y ciclofosfamida 60 mg/Kg/día del día -3 a -2 (dosis total: 120 mg/Kg). Los pacientes con Linfoma cerebral primario se acondicionaron con protocolo BCNU-Tiotepa, donde BCNU se utiliza a dosis de 400 mg/m^2 iv el día -6 y Tiotepa 5 mg/Kg/día los días -5 y -4 (dosis total: 10 mg/Kg).

Los pacientes diagnosticados de leucemia aguda recibieron el régimen BuCy, a base de busulfán entre $3,2$ a $4,8 \text{ mg/Kg}$ iv cada 24 horas (según se tratase de pacientes adultos $-3,2 \text{ mg/Kg}$ o de pacientes pediátricos según su peso) del día -7 al -4 (dosis total: $12,8-19,8 \text{ mg/Kg}$) y ciclofosfamida 60 mg/Kg IV al día los días -3 y -2 (dosis total: 120 mg/Kg). En la tabla 3 se representan las dosis de busulfán intravenoso según el peso en la edad pediátrica.

Los pacientes con mieloma múltiple fueron acondicionados con melfalán $100 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ iv durante los días -2 y -1 (dosis total: 200 mg/m^2) o BuMel con busulfán $3,2 \text{ mg/Kg/día}$ desde el día -5 a -3 (dosis total: $9,6 \text{ mg/Kg}$) y melfalán 140 mg/m^2 el día -1; en el caso de los pacientes en hemodiálisis se acondicionaron con melfalán $140 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ iv durante el día -2 en el día de descanso de la hemodiálisis.

Los pacientes afectos de meduloblastoma fueron acondicionados con Tiotepa-BCNU, a dosis de tiotepa $200 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ iv los días -5, -4 y -2 (dosis total: 600 mg/m^2) y de BCNU a dosis de $100 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ iv los días -5, -4 y -2 (dosis total: 300 mg/m^2); y con Tiotepa-Carboplatino, a dosis de tiotepa $200 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ iv los días -5, -4 y -2 (dosis total: 600 mg/m^2) y de carboplatino a dosis de $400 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ iv los días -5, -4 y -2 (dosis total: 1200 mg/m^2). En pacientes pediátricos con tumores sólidos se acondicionaron con protocolo BuMel, con busulfán $3,2-4,8 \text{ mg/Kg/día}$ desde el día -6 a -3 (dosis total: $12,8-19,8 \text{ mg/Kg}$) y melfalán 140 mg/m^2 el día -1.

Tabla 2. Acondicionamientos utilizados en los trasplantes autólogos de progenitores hematopoyéticos.

Régimen de Acondicionamiento	Diagnóstico	Fármacos
Melfalán 200 ^[243;244]	Mieloma múltiple	Melfalán 200 mg/m ²
Melfalán 140 ^[245]	Mieloma múltiple	Melfalán 140 mg/m ²
BuMel ^[246]	Mieloma múltiple	Busulfán iv 9,6 mg/Kg + Melfalán 140 mg/m ²
BEAM ^[247;248]	Linfomas agresivos Linfomas indolentes Linfomas de Hodgkin	Carmustina o BCNU 300 mg/m ² + Etopósido 800 mg/m ² + Citarabina 1600 mg/m ² + Melfalán 140 mg/m ²
BUCY ^[249;250]	Leucemias agudas mieloides Leucemias agudas linfoides	Busulfán iv 12,8 - 19,2 mg/Kg + Ciclofosfamida 120 mg/Kg
ICT-Cy ^[251]	Linfomas de Hodgkin Linfomas Agresivos	Irradiación corporal total 12 Gy + Ciclofosfamida 120 mg/Kg
BCNU-Tiotepa	Linfoma cerebral primario	Carmustina o BCNU 400 mg/m ² + Tiotepa 10 mg/Kg
Cy-ATG ^[252]	Esclerosis múltiple	Ciclofosfamida 200 mg/Kg + Globulina antitimocítica de conejo 6 mg/Kg
Tiotepa-BCNU ^[253]	Tumores embrionarios	Tiotepa 600 mg/m ² + Carmustina 300 mg/m ²
Tiotepa-Carboplatino ^[253]	Tumores embrionarios	Tiotepa 600 mg/m ² + Carboplatino 1200 mg/m ²
BuMel ^[254]	Tumores sólidos	Busulfán iv 12,8 - 19,2 mg/Kg + Melfalán 140 mg/m ²

Tabla 3. Dosis de busulfán intravenoso en pacientes pediátricos según peso del paciente.

Peso corporal real (Kg)	Dosis de Busulfán intravenoso (mg/Kg/día)
< 9	4,0
9 a < 16	4,8
16 a 23	4,4
> 23 a 34	3,8
> 34	3,2

VI. Infusión celular.

Transcurrido un margen mínimo de seguridad de 24 horas tras el final de la quimioterapia de acondicionamiento se procedió a la infusión del producto celular.

Con una técnica aséptica, las bolsas de criopreservación son extraídas del contenedor de nitrógeno líquido y rápidamente se sumergen en un baño de agua a 40°C. En el caso de los pacientes en los que se infundió el producto final sin lavar, se realizó la infusión en los siguientes 15 minutos a la descongelación. Se utilizó una premedicación a base de actocortina 100 mg iv, paracetamol 1 g iv, dexclorfeniramina 5 mg iv (o dosis equivalentes pediátricas). La infusión se llevó a cabo en la habitación de aislamiento del paciente con control de constantes y presión venosa central y, utilizando un filtro de agregados de 170 micras para evitar la infusión de microagregados. La infusión se realizó a través de una vía venosa central; para aquellos pacientes que se sometieron a varias infusiones, éstas se realizaron con un intervalo ≥ 20 minutos entre cada bolsa.

VII. Sistema automático de lavado de dimetilsulfóxido en productos hematopoyéticos descongelados.

En el grupo experimental, tras la descongelación de los PHSP, se procedió a su lavado mediante un sistema automatizado y cerrado con el procesador Sepax[®] S-100 (Biosafe S.A., Rte du Petit-Eysins, Eysins, Switzerland), para la depleción del DMSO y su posterior infusión.

VII.1- Sepax[®] S-100.

El Sepax[®] S-100 (fig. 23) es un procesador celular que consta de una cámara centrífuga para la separación de componentes sanguíneos según su densidad y tamaño. Este sistema utiliza equipos desechables estériles de un solo uso y el producto final se recoge en una bolsa de transferencia de 150 mL (Teruflex[®] transfer bag, Terumo Corporation, Tokio, Japón) lista para su uso clínico. La cámara centrífuga incorpora un sistema neumático (émbolo) que permite el llenado y vaciado así como la transferencia de los diferentes componentes a bolsas de recogida en un sistema de tubulares cerrado y estéril.

La cámara neumática produce una presión negativa (retirada del émbolo) que permite el paso de la suspensión celular de su bolsa inicial al interior de la cámara donde da comienzo la centrifugación que separará los componentes de la sangre y permite al finalizar el proceso, mediante la aplicación de una presión positiva (avance del émbolo) la transferencia de los componentes a diferentes compartimentos finales.



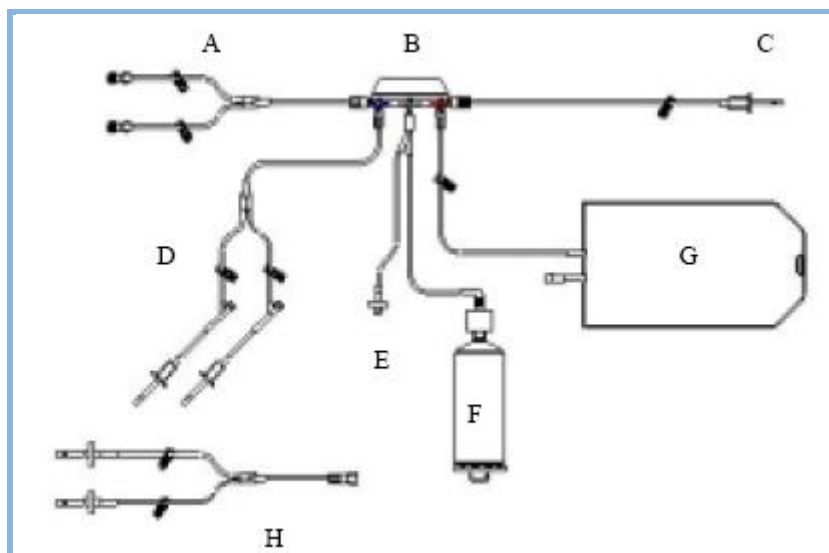
Fig. 23. Procesador celular Sepax® S-100.

VII.2- Equipo desechable (Kit CS-600.1 para el Sepax®).

El equipo desechable (fig. 24) consiste en un equipo de tubos apirogénicos, estéril y de un solo uso al que se conectan la/s solución/es de lavado, el producto inicial, una bolsa para desecho (sobrenadante) y una bolsa para el producto final.

VII.3- Protocolo de lavado (fig. 25).

Una vez conectadas las bolsas de muestra y de solución de lavado compuesta por suero salino al 0,9% (82,5 mL por cada 100 mL de solución final) con ACD-A (5 mL por cada 100



A: Doble línea de entrada. Conexión bolsa inicial. B: Distribuidor de llaves de paso. C: Entrada de la solución de lavado. D: Doble línea de salida. Conexión bolsa final. E: Transductor de presión. F: Cámara de separación. 220 mL. G: Bolsa de desecho. 1000 mL. H: Adaptador de conexión.

Fig. 24. Equipo desechable del sistema Sepax® S-100. (Tomado de Rodríguez L: "Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados: control de calidad, estabilidad osmótica y lavado de DMSO", Universitat Autònoma Barcelona, 2005, p 61).

mL de solución final; Baxter S. A., Lessines, Belgium) y albúmina humana al 20% (12,5 mL por cada 100 mL de solución final), la cámara centrífuga retira el émbolo y permite la entrada de la unidad de PHSP descongelados a su interior seguida de la entrada de un volumen igual de solución de lavado, la mezcla permanece durante cinco minutos en agitación para permitir el equilibrio osmótico de la muestra (1, 2). Posteriormente, se llena la cámara totalmente con solución de lavado (3) y da comienzo la centrifugación (4), los componentes celulares se separan por densidad hasta que el émbolo fuerza la salida del sobrenadante, en el que se encuentran los restos celulares y DMSO que van a la bolsa de desecho (5). Las células son entonces diluidas con 10 mL de solución de lavado para aumentar la recuperación y el émbolo las extrae hacia la bolsa final (6). Finalmente, la cámara es lavada una vez para minimizar las pérdidas celulares inespecíficas.

La dilución total de la muestra durante el lavado fue de 1:9. El proceso consumió una media de 28 minutos y el volumen final de la muestra fue de 100 mL. Para cada proceso se prepararon un mínimo de 300 mL de solución de lavado.

En los pacientes a los cuales se les lavó el producto final para eliminar el DMSO, tras la descongelación de la/s bolsa/s (hasta un volumen máximo de 220 mL), conectamos la bolsa/s a un sistema cerrado en el procesador Sepax[®] S-100 y la/s sometimos a lavado con una solución anteriormente descrita (suero salino al 0,9%, ACD-A y albúmina humana al 20%). A través de un punzón acoplador para toma de muestras (Fenwal Inc, Lake Zurich, IL, USA) se conectó la bolsa de los PHSP descongelados a un kit de lavado (Kit CS-600.1 para el Sepax[®]) y se realizó un programa de lavado consistente en un ciclo (para un volumen máximo de 220 mL de PHSP).

Tras haber realizado el lavado de los PHSP se tomaron muestras para conteo celular, determinación de células CD34+, controles microbiológicos, viabilidad celular y cultivos de colonias granulomacrofágicas, eritroides y megacariocíticas.

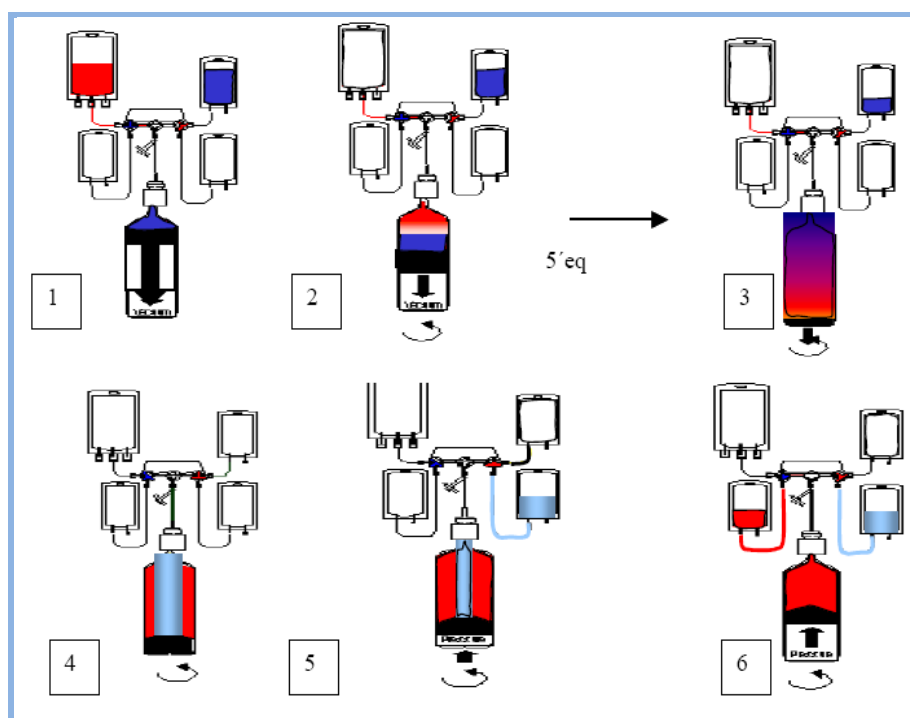


Fig. 25. Esquema del protocolo de lavado Sepax[®] S-100. (Tomado de Rodríguez L: "Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados: control de calidad, estabilidad osmótica y lavado de DMSO", Universitat Autònoma Barcelona, 2005, p 62).

VIII. Manejo clínico del paciente y criterio transfusional.

Los pacientes permanecieron ingresados en habitaciones individuales con medidas de aislamiento invertido simple y con filtros HEPA mientras el recuento de neutrófilos permaneció por debajo de $0,5 \times 10^9/L$. El cuidado corrió a cargo de equipos médicos y de enfermería de la Unidad de TPH según los protocolos estandarizados del programa de trasplante, y con presencia física las 24 horas. Se realizaron controles analíticos con periodicidad diaria (hemograma, creatinina, ionograma, urea) o dos/tres veces por semana (bioquímica general, coagulación, etc.). Se utilizaron antivíricos y antifúngicos azólicos por vía intravenosa de forma profiláctica (desde el inicio del acondicionamiento) y a partir del año 2007 se utilizó en los TASPE el meropenem anticipado (desde el día -1).

En caso de fiebre neutropénica se añadió al meropenem un glicopéptido y/o un aminoglucósido según la focalidad clínica, aislamientos microbiológicos o si el paciente presentaba inestabilidad hemodinámica. En caso de nuevo pico febril o persistencia de fiebre tras 4-7 días del inicio de los antibióticos se añadió anfotericina B liposomal o Caspofungina como tratamiento antifúngico empírico.

En el día +5 post-infusión de PHSP se administró G-CSF diariamente hasta que el paciente superase la cifra de 500 neutrófilos/mcL durante tres días consecutivos.

Se administraron transfusiones profilácticas de plaquetas ante recuentos inferiores a $10-15 \times 10^9/L$. Las transfusiones fueron en su mayor parte productos de donación dirigida mediante aféresis. En ausencia de plaquetas de aféresis se administraron dosis de 1 pool de plaquetas (5 unidades de plaquetas random procedentes de donaciones de sangre total). Se procuró la transfusión plaquetaria isogrupo siempre que fue posible. En casos de retraso prolongado del injerto plaquetar (más allá de seis semanas) en ausencia de causas de consumo plaquetar acelerado, el umbral para la transfusión profiláctica se bajó hasta $10 \times 10^9/L$. Se indicaron transfusiones de hematíes ante recuentos inferiores a 8 g/dL de hemoglobina. Salvo

circunstancias excepcionales, el número de unidades de hematíes concentrados (UHC) transfundidos cada vez fue de dos al día o 10 mL/Kg en los pacientes pediátricos con peso inferior a 40 Kg.

IX. Metodología estadística.

Para realizar el estudio, se diseñó una hoja de recogida de datos, cuyos pormenores se detallan a continuación:

Las variables demográficas de los pacientes y las características de las enfermedades tanto del grupo de los trasplantes con depleción de DMSO como en el grupo control se recogieron a partir de la historia clínica, mientras que los datos referentes a los procedimientos de recolección y las características del inóculo se obtuvieron de los registros disponibles en la sección de criobiología del Servicio de Hematología del HCUVA.

IX.1- Variables clínicas: demográficas y de la enfermedad.

Las variables recogidas en ambos grupos (control y deplecionado de DMSO) fueron las siguientes:

- Edad. Sexo. Peso. Diagnóstico.
- Líneas de tratamiento recibidas previas al trasplante.
- Acondicionamiento quimioterápico recibido.
- Máquina de aféresis utilizada.
- Número de infusiones de PH realizadas por trasplante en cada paciente.
- Número de días de fiebre durante el procedimiento del trasplante y microorganismo aislado en su caso.
- Número de días de hospitalización (contando a partir del día 0, para evitar las diferencias que pudiesen ocasionar el uso de diferentes acondicionamientos).

IX.2- Variables del inóculo.

Las características del inóculo que utilizamos como variables de seguridad del procedimiento del TPH tanto en el grupo control como en el deplecionado de DMSO tras el procedimiento de lavado fueron:

- Ausencia o presencia de efectos adversos relacionados con la infusión.
- Tipo de efecto adverso: exantema cutáneo/flush facial, disgeusia/picor de garganta, náuseas/vómitos, dolor abdominal, disnea/tos, hipoxia, bradicardia, taquicardia, hipertensión arterial, hipotensión arterial, aumento presión venosa central, fibrilación auricular, fiebre, alteraciones neurológicas, opresión torácica, cefalea.
- Células totales infundidas (10^8 /Kg paciente) por trasplante.
- Células CD34+ infundidas (10^6 /Kg paciente) por trasplante.
- Número de UFC-GM (10^4 /Kg paciente) del inóculo infundido.
- Número BFU-E (10^4 /Kg paciente) del inóculo infundido.
- Número de UFC Meg (10^4 /Kg paciente) del inóculo infundido.
- Control microbiológico del producto infundido por trasplante.
- Viabilidad celular del producto infundido por trasplante.

Las características del inóculo del grupo deplecionado de DMSO antes y después de someterse al procedimiento de lavado que también se recogieron se describen a continuación:

- Células totales antes y después del lavado (10^8 /Kg paciente) por trasplante.
- Células CD34+ antes y después del lavado (10^6 /Kg paciente) por trasplante.
- Número de UFC-GM (10^4 /Kg paciente) antes y después del lavado.
- Número BFU-E (10^4 /Kg paciente) antes y después del lavado.
- Número de UFC Meg (10^4 /Kg paciente) antes y después del lavado.
- Control microbiológico antes y después del lavado.
- Viabilidad celular antes y después del lavado.

IX.3- Variables del injerto hematopoyético.

Las variables del injerto hematopoyético que recogimos para estudio fueron:

- Día del trasplante en el que se produjo el injerto de leucocitos (primer día de tres días consecutivos con una cifra superior a 500 leucocitos/mcL).
- Día del trasplante en el que se produjo el injerto de neutrófilos (primer día de tres días consecutivos con una cifra superior a 500 neutrófilos/mcL).
- Día del trasplante en el que se produjo el injerto de plaquetas (primer día con cifra superior a 20.000 plaquetas/mcL mantenida sin requerimiento transfusional).
- Número de concentrados de hematíes y número de pools de plaquetas transfundidos durante el procedimiento del trasplante.

IX.4- Análisis estadístico.

Se realizó primero un estudio descriptivo, calculando las frecuencias y los porcentajes para las variables cualitativas, y las medias, desviaciones estándar, valores máximos y mínimos para las mediciones cuantitativas. El estudio descriptivo se llevó a cabo en la muestra global y en los subgrupos investigados. Se incluyó el cálculo de intervalos de confianza del 95%.

Parte de este proyecto se planteó como un estudio de **no inferioridad**, utilizando como variables de eficacia, los días de injerto de leucocitos, neutrófilos y plaquetas. Por tanto asumimos como hipótesis a demostrar, que el subgrupo de pacientes sometido al nuevo procedimiento no superaría un límite establecido *a priori* denominado “margen de no inferioridad” $\Delta_1 = 1$ día para el injerto de los leucocitos y de los neutrófilos y $\Delta_2 = 2$ días para el injerto de las plaquetas.

$$H_0: \mu_{NL} - \mu_L \leq \Delta_1$$

$$H_1: \mu_{NL} - \mu_L > \Delta_1$$

$$H_0: \mu_{NL} - \mu_L \leq \Delta_2$$

$$H_1: \mu_{NL} - \mu_L > \Delta_2$$

El resto de variables (aparición de fiebre, días de duración de la fiebre, requerimiento transfusional, consumo de CH y plaquetas) se comparó la existencias de diferencias entre los dos grupos. Se utilizó el test de la Chi-cuadrado cuando las variables eran cualitativas u ordinales con la corrección de Yates en caso necesario. Para contrastar los valores medios de las variables continuas usamos la T-Student tras confirmar la normalidad de la distribución mediante el test de Kolmogor-Smirnoff.

Todos los resultados se consideraron significativos para un nivel $\alpha < 0.05$.

El estudio de seguridad, se planteó como un estudio de superioridad típico de contraste de hipótesis, empleando para ello los parámetros de seguridad del procedimiento (eventos adversos durante la infusión).

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS v.18.0.

Para la elaboración de los restantes gráficos y la edición del trabajo se ha utilizado el procesador de textos Microsoft Office Word y Excel 2007.

RESULTADOS

Se describen en primer lugar los datos referentes a la homogeneidad del grupo control (sin depleción de DMSO) y del grupo experimental del estudio (con depleción de DMSO), tanto en las características clínicas de los pacientes como en las propiedades biológicas tras la descongelación. Seguidamente veremos en qué medida el procedimiento del lavado celular afecta a las células, cuantitativamente y funcionalmente, comparando los datos pre-lavado y post-lavado.

Finalmente expondremos los resultados de los trasplantes, con la composición del inóculo en los dos grupos, los efectos adversos durante la infusión, el injerto hematopoyético, los requerimientos transfusionales, las complicaciones infecciosas y los días de hospitalización.

I. Estudio de la homogeneidad de los dos grupos de trasplantes, con y sin depleción de dimetilsulfóxido.

En el estudio se han incluido un total de 128 TASPE. De ellos 64 conforman el grupo experimental en el que se utilizó el sistema automatizado y cerrado para la depleción de DMSO en los PHSP criopreservados. Como control utilizamos 64 TASPE realizados a una población histórica de pacientes a los cuales no se les había deplecionado el DMSO.

I.1- Estudio de la homogeneidad de las características de los pacientes en los dos grupos.

Las características clínicas más relevantes de ambos grupos se muestran en la tabla 4. La media de edad de toda la serie fue de $49,45 \pm 16,82$ años y su distribución por decenios se expone en el gráfico 1. En el grupo sin depleción de DMSO la edad media fue de $52,23 \pm 14,49$ años, con un rango entre 2,9 y 73 años, mientras que en el grupo deplecionado la media de edad fue de $46,67 \pm 18,56$ años con rango entre 1,5 y 72 años. No se observaron diferencias significativas en la edad de los grupos de estudio ($p=0,061$).

Tabla 4. Características de los pacientes sometidos a TPH autólogo.

Características	TPH no deplecionados DMSO	TPH deplecionados DMSO
Edad (años media+/- desviación)	52,23 ± 14,49	46,67 ± 18,56
Sexo (Hombre / Mujer)	37 / 27	39 / 25
Diagnóstico		
Mieloma múltiple	34	25
Linfomas agresivos	13	15
Linfomas indolentes	8	4
Leucemias agudas	4	3
Linfoma de Hodgkin	3	10
Tumores sólidos y EAI	2	7
Líneas de tratamiento previas al TPH		
1	35	18
2	24	32
≥3	5	14
Número de aféresis requeridas		
1	11	18
2	22	24
3	15	7
4	5	6
5	6	4
≥6	5	5
Número de infusiones realizadas por TPH		
1	11	18
2	22	24
3	15	7
4	5	6
5	6	4
≥6	5	5

EAI: Enfermedades autoinmunes. **PHSP:** Progenitores hematopoyéticos de sangre periférica. **TPH:** Trasplante progenitores hematopoyéticos.

El grupo de TPH sin depleción estuvo formado por 37 hombres y 27 mujeres mientras que en el grupo de TPH con depleción de DMSO se incluyeron 39 hombres y 25 mujeres. La distribución de los pacientes en cuanto a los diagnósticos de la enfermedad de base se resume en la tabla 4 y en el gráfico 2.

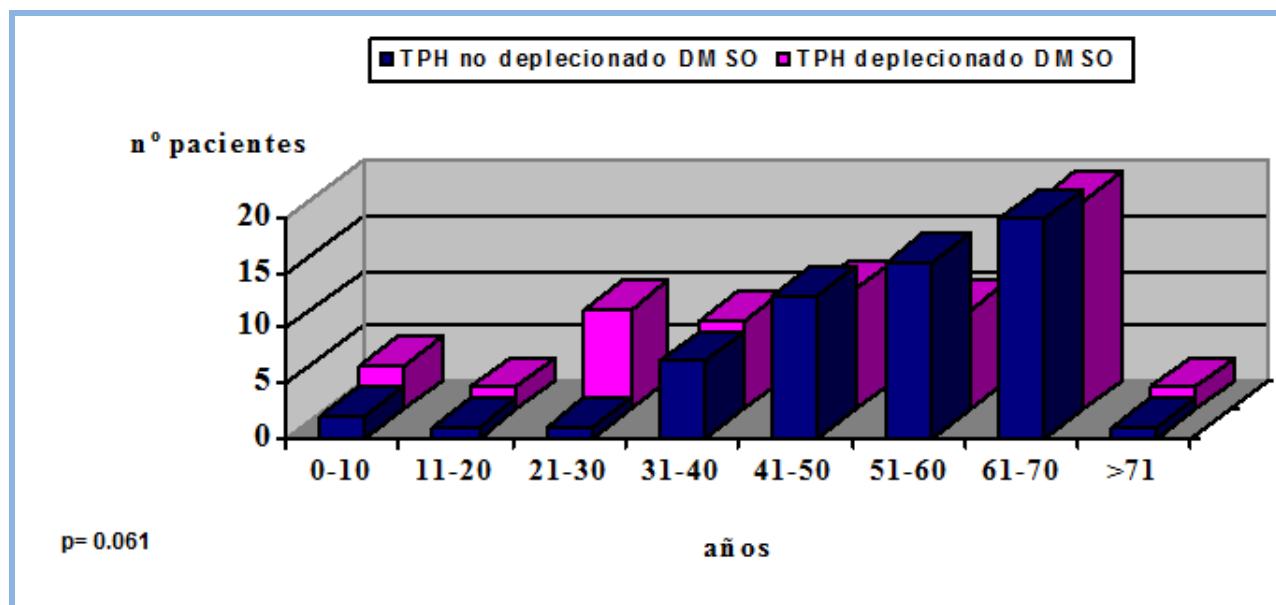


Gráfico 1. Distribución de la población según rangos de edad. **DMSO:** Dimetilsulfóxido. **TPH:** Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

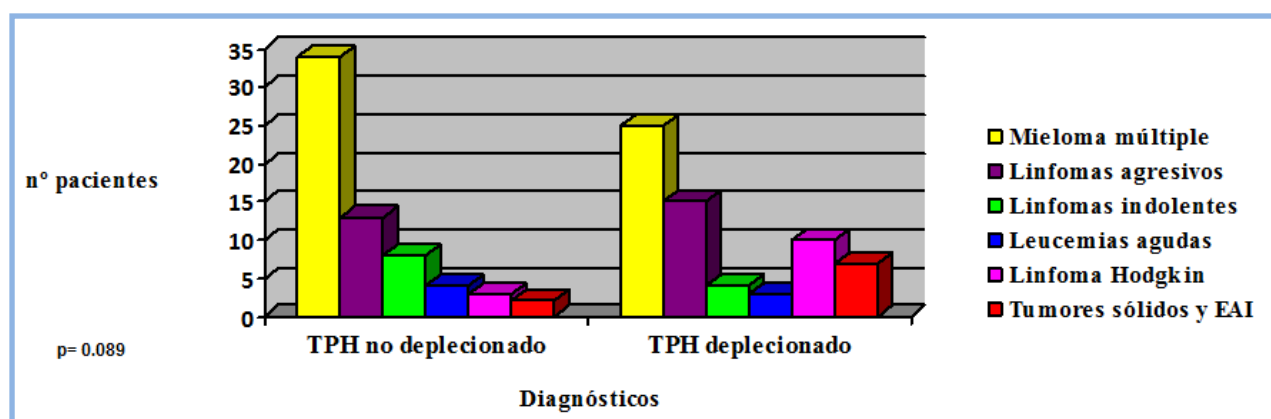


Gráfico 2. Distribución de la población por diagnósticos. **EAI:** Enfermedades autoinmunes. **TPH:** Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Tampoco observamos diferencias significativas entre los dos grupos en cuanto al sexo de los pacientes ($p=0,719$) o los diagnósticos de la enfermedad de base ($p=0,089$). En contraste, como se muestra en el gráfico 3, los pacientes con depleción de DMSO habían recibido un número de líneas de tratamiento antes del TASPE significativamente superior a los no deplecionados ($p=0,006$).

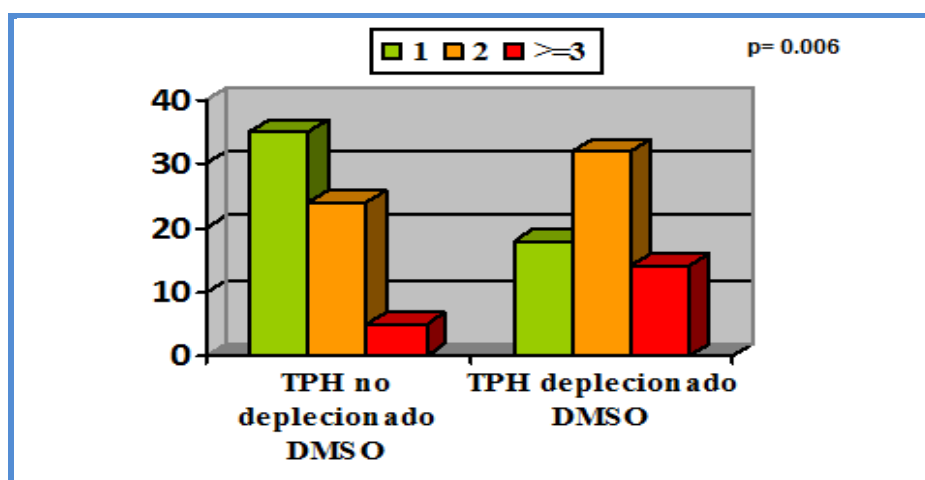


Gráfico 3. Distribución de la población según número de líneas de tratamiento recibidas antes del TASPE. **DMSO:** Dimetilsulfóxido. **TPH:** Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Las aféresis se realizaron con el procesador celular Fenwall CS-3000 plus[®] en 65 pacientes (13 pacientes del grupo TPH con depleción del DMSO y 52 pacientes del grupo TPH sin depleción de DMSO) y 63 con la Cobe[®] Spectra (51 pacientes del grupo TPH con depleción de DMSO y 12 pacientes del grupo TPH sin depleción del DMSO).

En el grupo de TPH sin depleción de DMSO los pacientes requirieron una media de $2,84 \pm 1,55$ aféresis para obtener al menos 2×10^6 de células CD34⁺ por Kg de peso corporal (objetivo prefijado para el trasplante), y en el grupo de TPH con depleción de DMSO la media fue de $2,62 \pm 1,81$ aféresis ($p=0,465$), representado en el gráfico 4.

Durante el tiempo que duraron las aféresis ningún paciente tuvo signos clínicos de infección, siendo el procedimiento bien tolerado en todos los pacientes en ambos grupos.

En la tabla 5 se recogen los trasplantes realizados con cada uno de los regímenes de acondicionamiento utilizados en la serie.

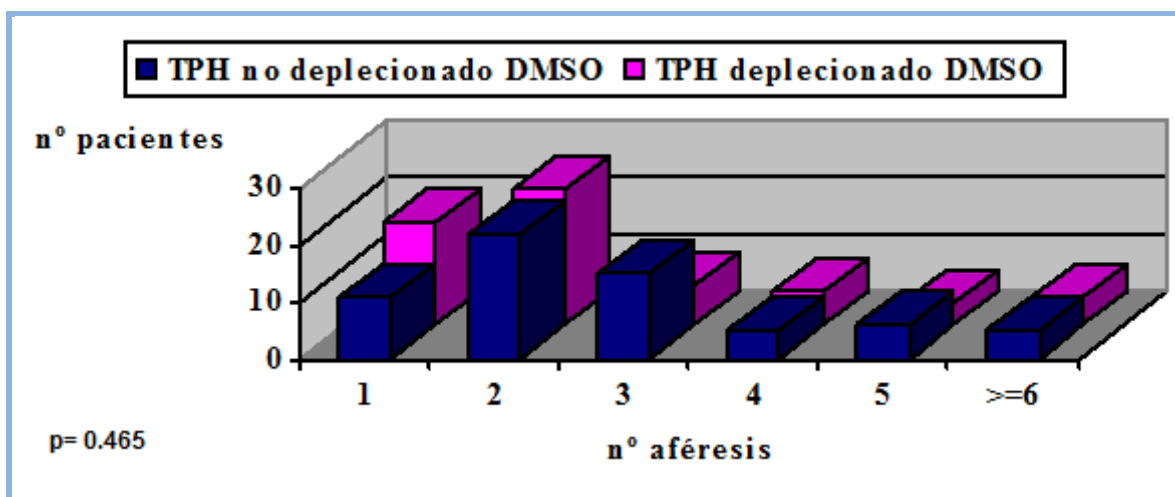


Gráfico 4. Distribución de la población según número de aféresis requeridas para obtener $2 \times 10^6/\text{Kg}$ peso del paciente de células CD34+. **DMSO:** Dimetilsulfóxido. **TPH:** Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Tabla 5. Regímenes de acondicionamiento utilizados en los TPH autólogos con y sin depleción de DMSO.

Régimen de Acondicionamiento	TPH no deplecionados DMSO	TPH deplecionados DMSO
Melfalán 200	34	19
Melfalán 140	0	6
BEAM	20	22
Z-BEAM	4	4
BUCY	4	3
ICT-Cy	0	2
Carboplatino-VP16-Melfalan	2	0
BuMel (tumores sólidos)	0	3
Otros	0	5
Total	64	64

BEAM: Carmustina, Etopósido, Citarabina, Melfalán. **BuCy:** Busulfán iv, Ciclofosfamida. **BuMel:** Busulfán iv, Melfalán. **DMSO:** Dimetilsulfóxido. **ICT-Cy:** Irradiación corporal total, Ciclofosfamida. **TPH:** Trasplante progenitores hematopoyéticos. **Z-BEAM:** Zevalín® (Ibritumomab tiuxetan), Carmustina, Etopósido, Citarabina, Melfalán.

Las medias de edad en los distintos grupos distribuidos según los diagnósticos se muestran en el gráfico 5 y la tabla 6.

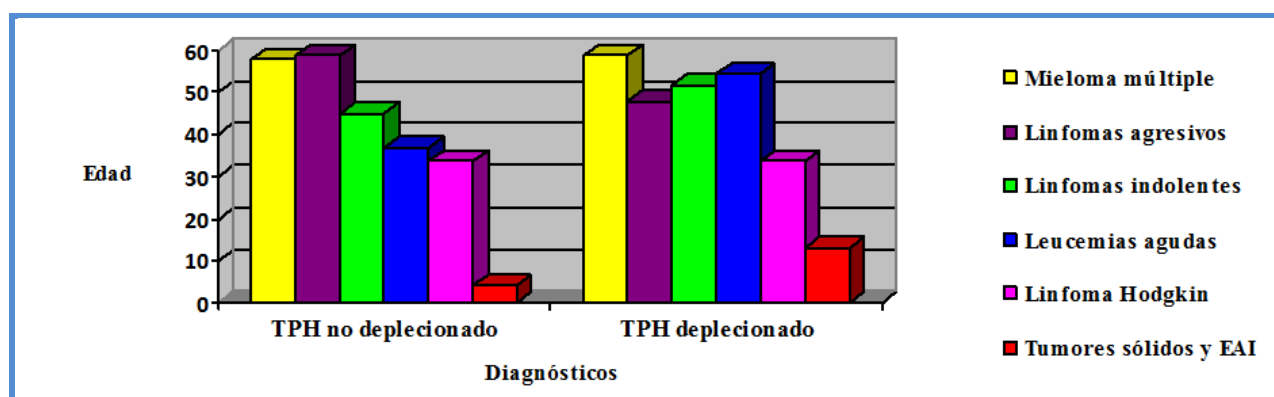


Gráfico 5. Distribución de edades (media) por enfermedades. **EAI:** Enfermedades autoinmunes. **TPH:** Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Tabla 6. Distribución de edades (media $\pm$ desviación estándar en años) según los diagnósticos de los grupos a estudio.

Diagnósticos	TPH no deplecionados DMSO	TPH deplecionados DMSO
Mieloma múltiple	57,76 $\pm$ 9,18	58,76 $\pm$ 8,46
Leucemias agudas	36,75 $\pm$ 10,24	54,33 $\pm$ 23,69
Linfomas agresivos	58,69 $\pm$ 7,48	48 $\pm$ 17,2
Linfomas indolentes	44,87 $\pm$ 9,17	51,75 $\pm$ 11,02
Linfoma de Hodgkin	33,66 $\pm$ 16,01	33,7 $\pm$ 3,88
Tumores sólidos y EAI	4,25 $\pm$ 3,88	12,98 $\pm$ 10,34

DMSO: Dimetilsulfóxido. **TPH:** Trasplante progenitores hematopoyéticos. **EAI:** enfermedad autoinmune.

En el gráfico 6 se representa la distribución de la población tanto en el grupo de TPH sin depleción como con depleción de DMSO, según el número de infusiones realizadas en cada trasplante. En el grupo de TPH con depleción de DMSO existe un número de pacientes que recibieron sólo una o dos infusiones significativamente más elevado ($p=0,049$). Esto se debe en parte a que en el procedimiento de lavado se mezclaron varias bolsas del mismo paciente obteniéndose una única bolsa para infundir (42 bolsas concentradas en 19 bolsas).

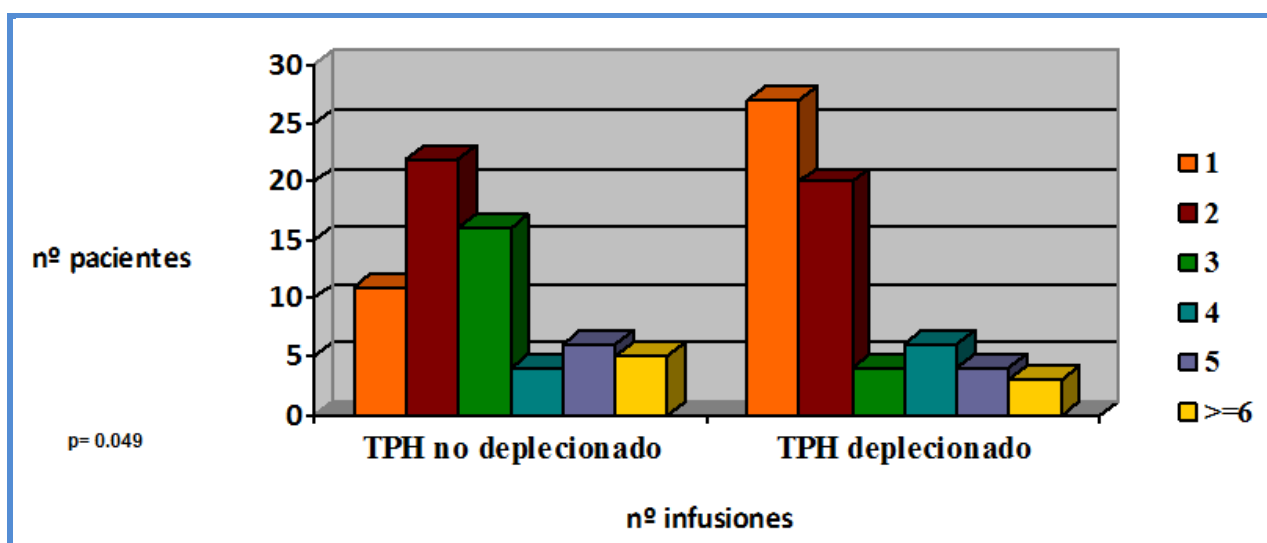


Gráfico 6. Distribución de pacientes según el número de infusiones realizadas. **TPH:** Trasplante progenitores hematopoyéticos.

I.2- Estudio comparativo de las características de los productos celulares, tras la descongelación, entre los grupos de trasplante de progenitores hematopoyéticos con y sin depleción de dimetilsulfóxido.

El número de bolsas congeladas en el grupo con depleción de DMSO fue de 166 y en el grupo sin depleción fue de 182 bolsas.

Las propiedades del producto celular criopreservado de ambos grupos fueron estudiadas inmediatamente tras la descongelación, antes de cualquier lavado, para comprobar su homogeneidad. Los parámetros analizados fueron las CT, las células CD34+ y viabilidad celular, también se realizaron cultivos clonogénicos (UFC-GM, BFU-E y UFC-Meg) para conocer la funcionalidad de los PH. Como se ha detallado en el material y métodos, todas estas determinaciones se llevaron a cabo en cada una de las bolsas descongeladas para cada trasplante, sumando los datos de las mismas y dividiéndolos por el peso del paciente. Los resultados de los dos grupos de trasplantes se muestran en la tabla 7. Como puede verse, no existieron diferencias entre los grupos en cuanto a la cantidad de CT, células CD34+,

progenitores eritroides y progenitores megacariocíticos. Sin embargo, la viabilidad celular fue significativamente inferior en el grupo con depleción de DMSO con respecto al grupo sin depleción (74,19% vs 82,25%; $p < 0,001$), y también fue significativamente inferior el recuento de UFC-GM en el grupo experimental con respecto al control sin depleción ($76,36 \pm 53,48 \times 10^4/\text{Kg}$ vs $101,36 \pm 71,78 \times 10^4/\text{Kg}$; $p = 0,028$) (tabla 7). Estos datos indican una menor riqueza y calidad del producto celular en el grupo de pacientes que iban a recibir trasplante con depleción de DMSO con respecto al control.

Tabla 7. Valores de los recuentos celulares (CT, CD34+, UFC-GM, BFU-E, UFC-Meg) por cada TASPE (media $\pm$ desviación estándar) en cada uno de los grupos a estudio tras la descongelación.

Variable	TPH sin depleción DMSO (n= 64)	TPH con depleción DMSO antes del lavado (n= 64)	Significación estadística (p)
CT $\times 10^8/\text{Kg}$	$5,97 \pm 3,43$	$6,29 \pm 4,47$	0,652
CD34+ $\times 10^6/\text{Kg}$	$4,03 \pm 3,07$	$5,15 \pm 4,62$	0,111
UFC-GM $\times 10^4/\text{Kg}$	$101,36 \pm 71,78$ (n= 63)	$76,36 \pm 53,48$ (n= 63)	0,028
BFU-E $\times 10^4/\text{Kg}$	$52,46 \pm 43,1$ (n= 60)	$43,27 \pm 35,52$ (n= 63)	0,198
UFC-Meg $\times 10^4/\text{Kg}$	$32,69 \pm 29,55$ (n= 57)	$41,82 \pm 43,07$ (n= 56)	0,191
Viabilidad celular (%)	$82,25 \pm 8,75$	$74,19 \pm 9,77$	<0.001

BFU-E: Unidad formadora de explosiones de colonias o "Burst forming unit" eritroides. CT: Células totales. CD34+: Células progenitores hematopoyéticas CD34 positivas. DMSO: Dimetilsulfóxido. TASPE: Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica. TPH: Trasplante progenitores hematopoyéticos. UFC-GM: Unidad formadora de colonias granulomacrofágicas. UFC-Meg: Unidad formadora de colonias megacariocíticas.

II. Estudio de los efectos del procedimiento de lavado de dimetilsulfóxido sobre los progenitores hematopoyéticos.

Cualquier manipulación llevada a cabo con células en el laboratorio puede afectar tanto a la cantidad como a la función de las mismas, lo que puede afectar a la calidad del injerto hematopoyético. De igual modo la manipulación puede incrementar el riesgo de contaminación

bacteriana, incluso realizando los procedimientos en campana de flujo laminar y observando todas las medidas de asepsia. Por este motivo, se procedió al estudio del impacto del procedimiento del lavado de DMSO sobre variables con repercusión conocida sobre la calidad del producto celular final, y para ello se compararon estas variables antes y después del lavado.

II.1- Estudio de la eficacia del procedimiento de lavado celular para la depleción de dimetilsulfóxido.

Para estudiar cómo afecta el procedimiento de la depleción de DMSO a la calidad del producto celular final, comparamos antes y después del lavado las siguientes variables: CT, CD34+, viabilidad celular, UFC-GM, BFU-E y UFC-Meg en las 166 bolsas descongeladas antes del procedimiento de lavado y en las 143 bolsas resultantes tras el procedimiento de depleción. Ya se ha comentado previamente que 42 bolsas se sometieron al procedimiento de lavado con la mezcla de varias de ellas, pues el volumen resultante era lo suficiente para aprovechar un kit de lavado.

Como puede verse en la tabla 8, es importante resaltar que no se apreciaron pérdidas estadísticamente significativas ni en la cantidad de células CD34+, ni de progenitores megacariocíticos ni en la viabilidad celular antes y después del lavado del DMSO. Aunque las células totales disminuyeron significativamente tras el procedimiento del lavado en comparación con los datos obtenidos antes del lavado ($2,05 \times 10^8/\text{Kg}$ vs $2,43 \times 10^8/\text{Kg}$; $p < 0,001$), paralelamente se observó un incremento significativo en el recuento de UFC-GM ($34,60 \times 10^4/\text{Kg}$ vs $23,50 \times 10^4/\text{Kg}$, $p = 0,001$) y de BFU-E ($19,38 \times 10^4/\text{Kg}$ vs $13,45 \times 10^4/\text{Kg}$, $p = 0,004$) tras el lavado del DMSO.

El cálculo en porcentajes de todos estos parámetros en el producto celular tras el lavado con respecto al producto antes del mismo, para conocer los porcentajes de recuperación se

exponen en la tabla 9. Contrasta la disminución de la recuperación de las CT (72%), mientras que paralelamente existe una recuperación superior al 150% en las unidades formadoras de colonias, aunque se advierte una gran dispersión de los datos.

Tabla 8. Datos de los valores celulares y de la viabilidad en las bolsas descongeladas antes y después de los lavados (media $\pm$ desviación estándar).

Variable	Bolsas deplecionadas de DMSO		Significación estadística (p)
	Antes lavado (n=166)	Tras lavado (n=143)	
CT $\times 10^8$ /Kg	2,43 $\pm$ 1,04	2,05 $\pm$ 0,83	<0,001
CD34+ $\times 10^6$ /Kg	1,97 $\pm$ 2,87	2,12 $\pm$ 2,66	0,631
UFC-GM $\times 10^4$ /Kg	23,50 $\pm$ 24,43	34,60 $\pm$ 32,86	0,001
BFU-E $\times 10^4$ /Kg	13,45 $\pm$ 14,69	19,38 $\pm$ 20,46	0,004
UFC-Meg $\times 10^4$ /Kg	22,82 $\pm$ 26,34 (n= 79)	19,54 $\pm$ 36,67 (n= 102)	0,494
Viabilidad celular (%)	74,86 $\pm$ 10,67	74,51 $\pm$ 10,72	0,775

BFU-E: Unidad formadora de explosiones de colonias o "Burst forming unit" eritroides. **CT:** Células totales. **CD34+:** Células progenitores hematopoyéticas CD34 positivas. **DMSO:** Dimetilsulfóxido. **TASPE:** Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica. **TPH:** Trasplante progenitores hematopoyéticos. **UFC-GM:** Unidad formadora de colonias granulomacrofágicas. **UFC-Meg:** Unidad formadora de colonias megacariocíticas.

Tabla 9. Recuperación post-lavado de los valores celulares y de la viabilidad respecto a los observados antes del procedimiento del lavado (media $\pm$ desviación estándar).

Variable	Recuperación (%)
CT $\times 10^8$ /Kg	72,37 $\pm$ 15,63
CD34+ $\times 10^6$ /Kg	101,44 $\pm$ 27,84
UFC-GM $\times 10^4$ /Kg	157,08 $\pm$ 105,96
BFU-E $\times 10^4$ /Kg	170,24 $\pm$ 181,01
UFC-Meg $\times 10^4$ /Kg	185,93 $\pm$ 329,28 (n= 79)
Viabilidad celular	101,91 $\pm$ 13,18

BFU-E: Unidad formadora de explosiones de colonias o "Burst forming unit" eritroides. **CT:** Células totales. **CD34+:** Células progenitores hematopoyéticas CD34 positivas. **DMSO:** Dimetilsulfóxido. **TASPE:** Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica. **TPH:** Trasplante progenitores hematopoyéticos. **UFC-GM:** Unidad formadora de colonias granulomacrofágicas. **UFC-Meg:** Unidad formadora de colonias megacariocíticas.

II.2- Estudio de la seguridad del procedimiento de lavado para la depleción de dimetilsulfóxido.

En cuanto a los datos de contaminación microbiológica del procedimiento de depleción del DMSO mediante el Sepax[®] S-100, obtuvimos que, de un total de 166 bolsas descongeladas, antes del lavado se aislaron 8 agentes microbiológicos (4,81%), y tras el lavado se aislaron 9 agentes microbiológicos en 143 bolsas (6,29%), sin existir diferencias estadísticamente significativas ($p=0,572$) (gráfico 7).

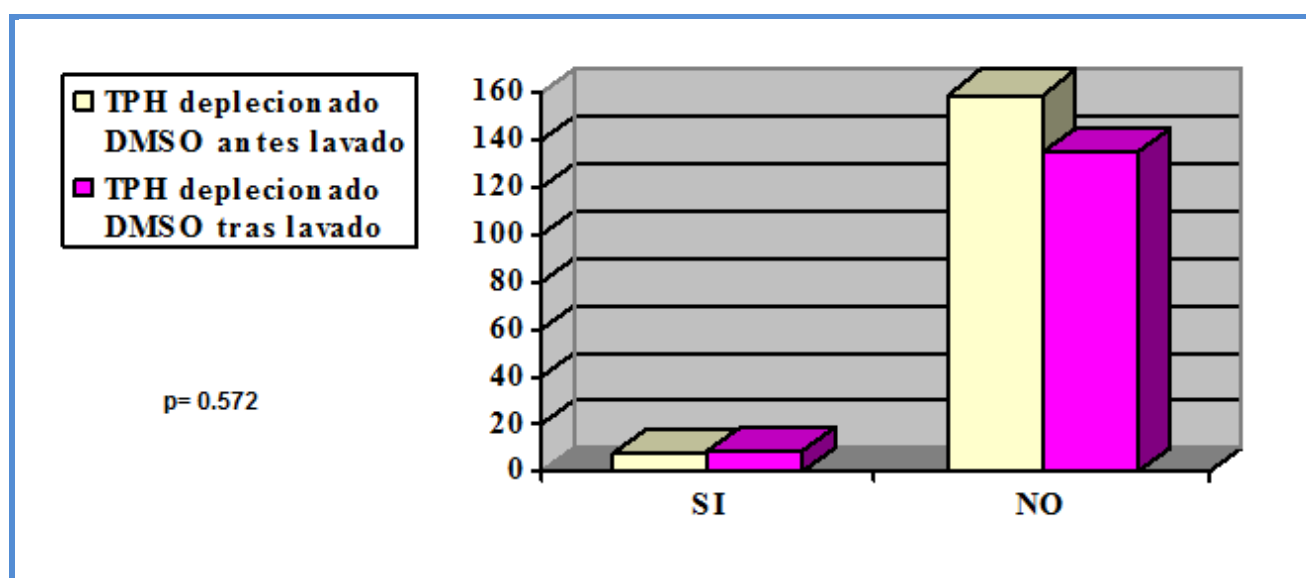


Gráfico 7. Contaminación bacteriana en las bolsas de PH en el grupo de TPH con depleción del DMSO antes y después de ser lavados. **DMSO:** Dimetilsulfóxido. **TPH:** Trasplante progenitores hematopoyéticos.

Los microorganismos aislados en las bolsas antes del proceso de lavado fueron: 6 *Staphylococcus* (*epidermidis*: 4, *hominis*: 2); y 2 *Streptococcus* (1 *Streptococcus sp* y 1 *Streptococcus viridans*). Tras el procedimiento de depleción del DMSO, los microorganismos aislados fueron: 7 *Staphylococcus* (*epidermidis*: 4, *hominis*: 1, *warnerii*: 2); 1 *Streptococcus viridans* y 1 Bacilo gram negativo fermentador (tabla 10). En cinco bolsas coincidieron los aislamientos microbiológicos antes y después del procedimiento de lavado.

Tabla 10. Distribución de los gérmenes bacterianos identificados en los cultivos de control de las bolsas antes y después del proceso de lavado.

Código TPH (nº de bolsas)	nº de bolsas con cultivos positivos	Microorganismo	
		Antes lavado	Tras lavado
224 (1 bolsa)	1	<i>Staphylococcus hominis</i>	Negativo
228 (3 bolsas)	1	<i>Streptococcus sp</i>	Negativo
	2-3	Negativos	Negativos
227 (4 bolsas)	1	Negativo	<i>Streptococcus viridans</i>
	2-4	Negativos	Negativos
234 (1 bolsa)	1	<i>Streptococcus viridans</i>	Negativo
238 (1 bolsas)	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
259 (5 bolsas)	1	Negativo	<i>Staphylococcus warnerii</i>
	2-5	Negativos	Negativos
260 (2 bolsas)	1	Negativo	Bacilo gram negativo fermentador
	2	Negativo	Negativo
262 (7 bolsas)	1	Negativo	<i>Staphylococcus warnerii</i>
	2-7	Negativos	Negativos
270 (7 bolsas)	1	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
	2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	3-7	Negativos	Negativos
271 (2 bolsas)	1-2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

DMSO: Dimetilsulfóxido. **TPH:** Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

III. Comparación de la seguridad y eficacia del trasplante del progenitores hematopoyéticos entre el grupo control y grupo experimental.

Para valorar la seguridad y eficacia del TPH con el producto celular lavado, se realizó un estudio comparativo de este grupo de pacientes con respecto a un grupo control considerando por un lado la composición celular del inóculo y las reacciones adversas tras la infusión, y por otro lado su impacto en el injerto hematopoyético, y en las necesidades de soporte hemoterápico, y días de fiebre y hospitalización.

III.1- Características del inóculo celular.

Los resultados de las variables relacionadas con el inóculo, indicativas de la eficacia técnica del procedimiento, se resumen en la tabla 11 y se detallan a continuación:

III.1.1- Composición celular del inóculo.

La media de CT en el momento de la infusión en cada paciente del grupo de TPH sin depleción de DMSO fue de $5,97 \pm 3,43 \times 10^8/\text{Kg}$. La media de células CD34+ fue de $4,03 \pm 3,07 \times 10^6/\text{Kg}$, y la media de la viabilidad celular tras su descongelación fue de $82,25 \pm 8,75\%$ respectivamente (tabla 11).

En el grupo experimental de TPH con depleción de DMSO la media de CT en el momento de la infusión fue de $4,6 \pm 3,57 \times 10^8/\text{Kg}$ y para las células CD34+ de $4,77 \pm 3,74 \times 10^6/\text{Kg}$. Tras el proceso de lavado la media de la viabilidad celular fue de $74,99 \pm 9,87 \%$.

Como puede verse en la tabla 11 la comparación de los datos de los productos celulares infundidos entre los grupos de estudio, demostró un incremento significativo en el número de células totales ($p=0,029$), y en la viabilidad celular DMSO ($p<0,001$), en el grupo de pacientes sometidos a TPH sin depleción de DMSO con respecto al deplecionado, aunque la cifra de células CD34+ fue similar en ambos grupos.

III.1.2- Unidades formadoras de colonias granulomacrofágicas, eritroides y megacariocíticas.

El recuento de colonias UFC-GM, BFU-E y UFC-Meg presentes en el producto a infundir se consideró como índice de eficacia desde un punto de vista cualitativo. La media del número de colonias por TASPE en cada paciente del grupo control antes de la infusión fue de $101,36 \pm 71,78 \times 10^4/\text{Kg}$ UFC-GM, de $52,46 \pm 43,1 \times 10^4/\text{Kg}$ BFU-E, y de $32,69 \pm 29,55 \times 10^4/\text{Kg}$ UFC-Meg (tabla 11).

En cuanto al número de colonias por TASPE del grupo de TPH con depleción de DMSO tras el lavado y antes de la infusión, fue de $103,76 \pm 74,67 \times 10^4/\text{Kg}$ CFU-GM, de $58,83 \pm 53,35 \times 10^4/\text{Kg}$ BFU-E y de $41,89 \pm 57,37 \times 10^4/\text{Kg}$ CFU-Meg.

No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos (tabla 11).

Tabla 11. Valores de los recuentos celulares (CT, CD34+, UFC-GM, BFU-E, UFC-Meg) en el inóculo infundido por cada TASPE (media $\pm$ desviación estándar) en cada uno de los grupos a estudio.

Variable	TPH sin depleción DMSO (n= 64)	TPH con depleción DMSO (n= 64)	Significación estadística (p)
CT $\times 10^8/\text{Kg}$	$5,97 \pm 3,43$	$4,6 \pm 3,57$	0,029
CD34+ $\times 10^6/\text{Kg}$	$4,03 \pm 3,07$	$4,77 \pm 3,74$	0,224
UFC-GM $\times 10^4/\text{Kg}$	$101,36 \pm 71,78$ (n= 63)	$103,76 \pm 74,67$	0,854
BFU-E $\times 10^4/\text{Kg}$	$52,46 \pm 43,1$ (n= 60)	$58,83 \pm 53,35$	0,467
UFC-Meg $\times 10^4/\text{Kg}$	$32,69 \pm 29,55$ (n= 57)	$41,89 \pm 57,37$ (n= 50)	0,286
Viabilidad celular (%)	$82,25 \pm 8,75$	$74,99 \pm 9,87$	<0.001

BFU-E: Unidad formadora de explosiones de colonias o "Burst forming unit" eritroides. **CT:** Células totales. **CD34+:** Células progenitores hematopoyéticas CD34 positivas. **DMSO:** Dimetilsulfóxido. **TASPE:** Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica. **TPH:** Trasplante progenitores hematopoyéticos. **UFC-GM:** Unidad formadora de colonias granulomacrofágicas. **UFC-Meg:** Unidad formadora de colonias megacariocíticas.

III.2- Estudio de la seguridad del procedimiento de infusión del inóculo en el trasplante de progenitores hematopoyéticos.

En este apartado se consideran dos grupos de variables de seguridad: las reacciones adversas durante la infusión y la contaminación bacteriana del inóculo.

III.2.1- Reacciones adversas durante la infusión de progenitores hematopoyéticos.

En el grupo de TPH sin depleción del DMSO se infundieron 182 bolsas y se documentaron reacciones adversas en 33 pacientes (51,6%), pudiéndose observar en un mismo paciente varias de ellas. Las reacciones adversas más frecuentes fueron: flush

facial o exantema (18), opresión torácica (13), disgeusia (6), náuseas (6), dolor abdominal (6), hipoxia (5), bradicardia (3), cefalea (2), taquicardia (1) y disnea (1) (gráfico 8); mientras que en el grupo de TPH con depleción del DMSO no se observó reacción adversa alguna ($p<0,001$) (gráfico 9).

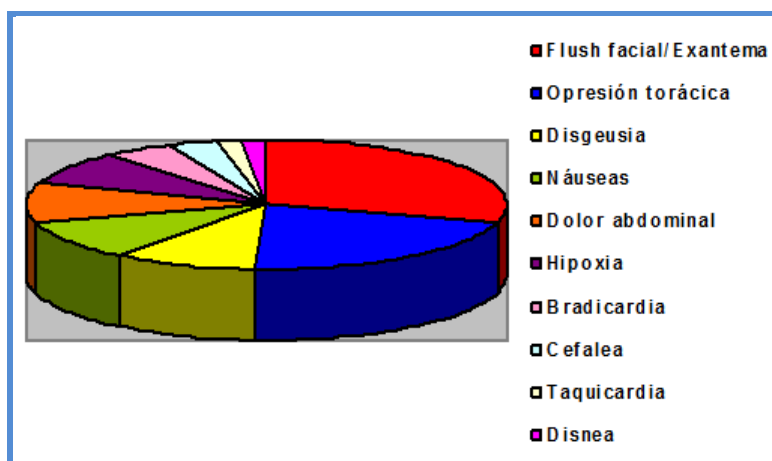


Gráfico 8. Efectos adversos más frecuentes en grupo de TPH sin depleción de DMSO.

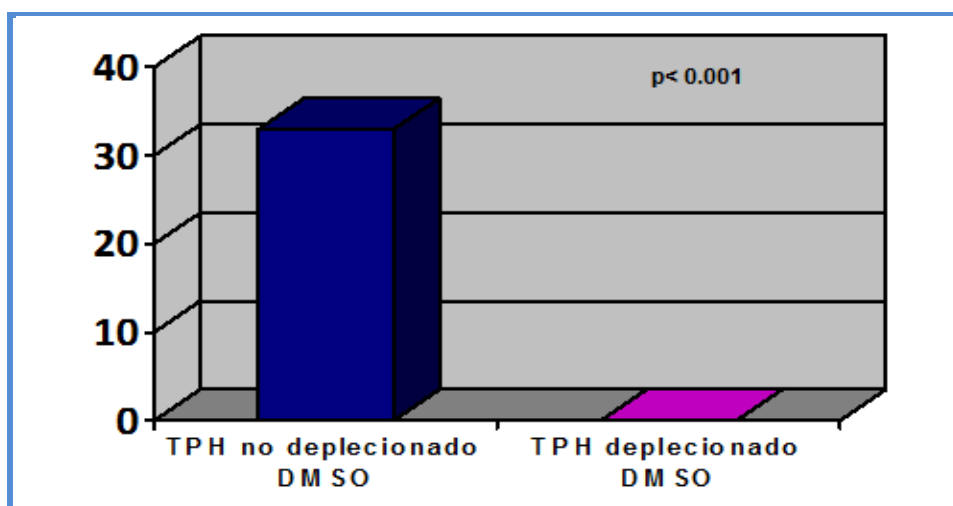


Gráfico 9. Número de pacientes con efectos adversos tras infusión de progenitores hematopoyéticos. **DMSO:** Dimetilsulfóxido. **TPH:** Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

III.2.2- Contaminación bacteriana.

A pesar de las medidas de esterilidad adoptadas para la manipulación de PH, durante los procedimientos de recolección, criopreservación y depleción del DMSO, existe riesgo de contaminación bacteriana.

En nuestra serie la contaminación bacteriana documentada en el grupo de los TPH sin deplecionar de DMSO fue de 17 aislamientos microbiológicos de un total de 182 bolsas (9,34%); mientras que tan sólo se documentaron 9 aislamientos en 144 bolsas (6,25%) en el grupo de los TPH deplecionados tras someterse al procedimiento de lavado del DMSO, una diferencia sin significación estadística ($p=0,298$) (gráfico 10).

En la tabla 12 se representa los diferentes microorganismos aislados en los estudios microbiológicos de ambos grupos. Los microorganismos aislados con más frecuencia fueron los *Staphylococcus* (7 *S. epidermidis*, 2 *S. hominis*, 1 *S. coagulasa negativo*, 1 *S. warnerii*), además de 2 *Streptococcus* y 1 *Stenotrophomonas maltophilia*.

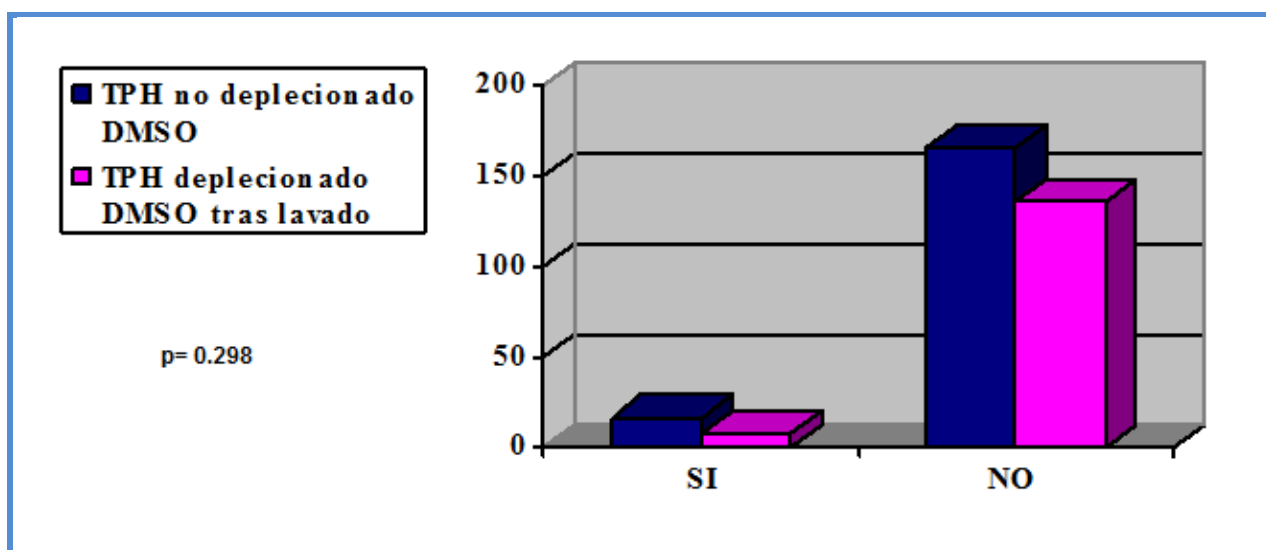


Gráfico 10. Contaminación bacteriana en las bolsas de PH en el grupo de TPH sin y en el grupo con depleción del DMSO después de ser lavados. **DMSO:** Dimetilsulfóxido. **TPH:** Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Tabla 12. Distribución de los gérmenes bacterianos identificados en los cultivos de control.

Contaminación bacteriana					
TPH sin depleción DMSO			TPH con depleción DMSO		
Código TPH	nº de bolsa	Microorganismo	Código TPH	nº de bolsa	Microorganismo
					Tras lavado
137 (2 bolsas)	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	227 (4 bolsas)	1	<i>Streptococcus viridans</i>
	2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		2-4	Negativos
141 (2 bolsas)	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	234 (1 bolsa)	1	Negativo
	2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	238 (1 bolsa)	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
146 (3 bolsas)	1	<i>Streptococcus sp</i>	259 (5 bolsas)	1	<i>Staphylococcus warnerii</i>
	2	<i>Streptococcus sp</i>		2-5	Negativos
	3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	260 (2 bolsas)	1	Bacilo gram negativo fermentador
147 (5 bolsas)	1	<i>Staphylococcus warnerii</i>		2	Negativo
	2-5	Negativos	262 (7 bolsas)	1	<i>Staphylococcus warnerii</i>
161 (2 bolsas)	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		2-7	Negativos
	2	Negativo	270 (7 bolsas)	1	<i>Staphylococcus hominis</i>
166 (2 bolsas)	1	<i>Staphylococcus hominis</i>		2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	2	Negativo		3-7	Negativos
183 (1 bolsa)	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	271 (2 bolsas)	1-2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
198 (4 bolsas)	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>			
	2-4	Negativos			
202 (2 bolsas)	1	<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>			
	2-3	Negativos			
206 (4 bolsas)	1-4	<i>Staphylococcus hominis</i>			

DMSO: Dimetilsulfóxido. **TPH:** Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

III.2.3- Tiempos de injerto leucocitario y plaquetar.

Del total de 128 trasplantes de la serie todos injertaron, llegando a recuperar una cifra de neutrófilos superior a $0,5 \times 10^9/L$. Durante el TPH se observaron sólo dos éxitos (1,56% del total), uno en el día +18 y otro en el día +31 postrasplante, ambos en el grupo de pacientes con depleción del DMSO. El primer paciente era un mujer de 50 años de edad diagnosticada de mieloma múltiple que recibió como acondicionamiento melfalán 200 y que desarrolló una sepsis y progresión de su enfermedad; el segundo era un hombre de 62 años diagnosticado de mieloma múltiple que recibió como acondicionamiento melfalán 200 y que presentó como complicación sepsis y fracaso renal. Estos dos pacientes no llegaron a recuperar una cifra de plaquetas estable superior a $20 \times 10^9/L$, no obstante, la muerte no fue debida a hemorragia en ninguno de los dos.

La hipótesis de investigación fue que una la intervención de la depleción de DMSO no fue clínicamente inferior a la no depleción si los intervalos de confianza (IC) que las compararon cubren valores menores a los preespecificados. Se consideró aceptable una diferencia de 1 día (Δ_1) para probar la no inferioridad del tratamiento que implicaba el procedimiento de lavado con respecto al que no llevaba el lavado para las variables injerto leucocitario y neutrofílico y una diferencia de 2 días (Δ_2) para la variable injerto plaquetar. Las medias y diferencias en las medias de días hasta recuperación hematológica y sus intervalos de confianza del 95% (IC) se presentan en la tabla 13.

El número de días hasta alcanzar el injerto leucocitario (leucocitos $>0,5 \times 10^9/L$) fue de 10,31 en el grupo de pacientes en el que los PH no se sometieron al procedimiento de lavado y de 10,25 días en aquellos pacientes que si fueron sometidos al procedimiento de lavado, las diferencias absolutas en las medias de días fueron de 0,06 días (IC -0,34 a 0,45 días). El número de días hasta alcanzar el injerto neutrofílico (neutrófilos $>0,5 \times 10^9/L$) fue de 11,05 en el grupo de pacientes en el que los PH no se sometieron al procedimiento de

lavado y de 10,98 días en aquellos pacientes que si fueron sometidos al procedimiento de lavado, las diferencias absolutas en las medias de días fueron de 0,06 días (IC -0,80 a 0,92 días). Dado el Δ_1 que hemos utilizado para las variables injerto leucocitario y neutrofílico probamos la no inferioridad del tratamiento que implicaba el procedimiento de depleción del DMSO lavado con respecto al grupo que no se manipulaba el injerto (gráfico 11).

Tabla 13. Parámetros estadísticos de injerto leucocitario, neutrofílico y plaquetar en cada uno de los grupos a estudio.

	Media no lavados	Media lavados	Diferencia de medias	Error típico de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
Días injerto leucocitos	10,31	10,25	0,06	0,20	-0,34	0,45
Días injerto neutrófilos	11,05	10,98	0,06	0,43	-0,80	0,92
Días injerto plaquetar	11,25	13,17	-1,92	1,00	-3,92	0,07

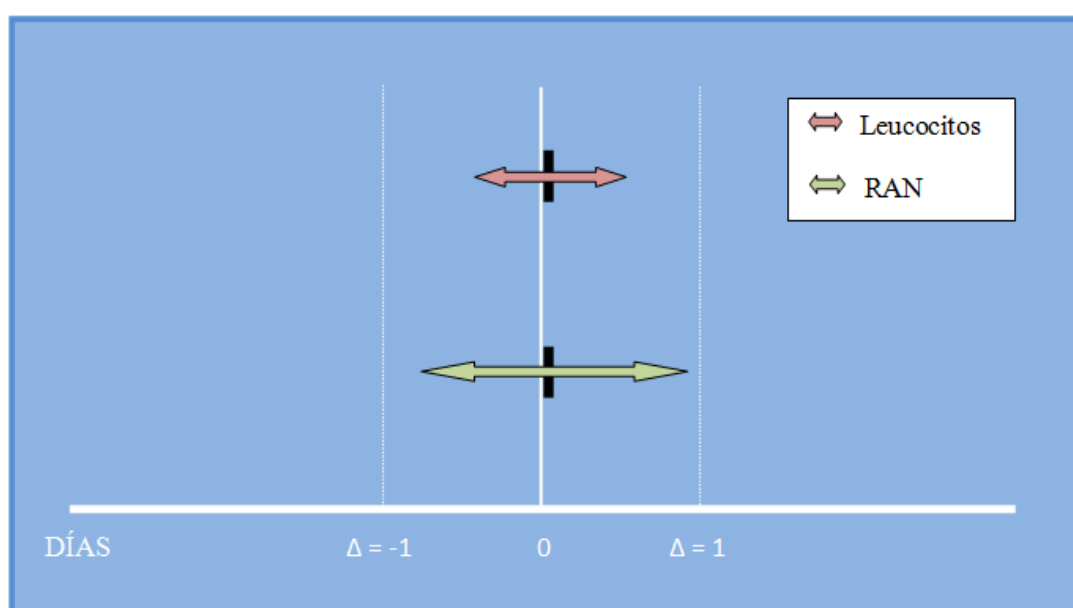


Gráfico 11. Intervalos de confianza 95% para la diferencia entre los grupos en cuanto al día de injerto leucocitario ($>0,5 \times 10^9/L$) y neutrofílico ($>0,5 \times 10^9/L$).

Ningún paciente alcanzó el injerto de neutrófilos antes del día +8. Sin embargo, en la segunda semana postrasplante el 96,92% de los pacientes vivos de ambos grupos habían injertado de neutrófilos. El paciente que más tiempo tardó en alcanzar el injerto granulocítico fue en el día +15 en el grupo de TPH sin depleción de DMSO y en el día +34 en el grupo de TPH con depleción de DMSO (gráficos 12 y 13). Éste último paciente trasplantado por una leucemia aguda mieloide, tras objetivar un inicio de recuperación sin cumplir criterios de injerto granulocítico presentó episodio febril documentándose infección por citomegalovirus, lo que pudo contribuir al retraso del injerto.

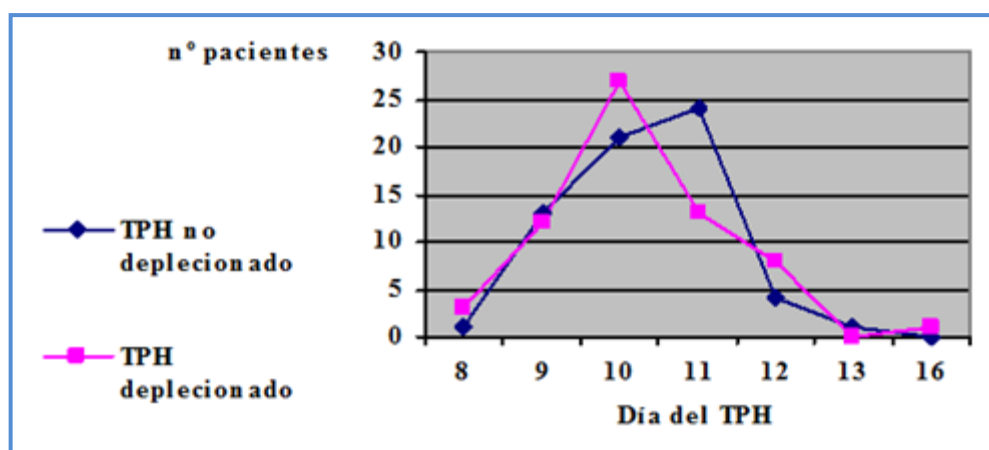


Gráfico 12. Día injerto Leucocitos (>0,5 x10⁹/L). TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

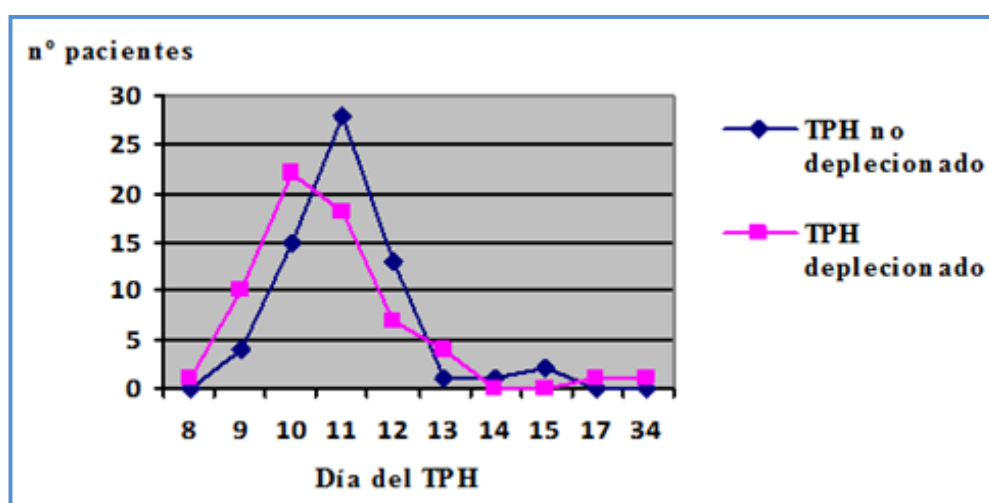


Gráfico 13. Día de injerto de Neutrófilos (>0,5 x10⁹/L). TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

En las tablas 14 y 15 se muestra la distribución de los pacientes según el día de injerto para leucocitos y para neutrófilos respectivamente.

Tabla 14. Número de pacientes en los dos grupos del estudio, según el día de injerto leucocitario ($>0,5 \times 10^9/L$).

Día injerto leucocitario	8	9	10	11	12	13	16
TPH sin depleción DMSO	1	13	21	24	4	1	0
TPH con depleción DMSO	3	12	27	13	8	0	1

Tabla 15. Número de pacientes en los dos grupos del estudio, según el día de injerto de neutrófilos ($>0,5 \times 10^9/L$).

Día injerto granulocítico	8	9	10	11	12	13	14	15	17	34
TPH sin depleción DMSO	0	4	15	28	13	1	1	2	0	0
TPH con depleción DMSO	1	10	22	18	7	4	0	0	1	1

El número de días hasta alcanzar una cifra de plaquetas superior a $20 \times 10^9/L$ fue de 11,25 en el grupo de pacientes cuya sangre no fue sometida al procedimiento de lavado y de 13,17 días en aquellos pacientes que si fueron sometidos al procedimiento de lavado, las diferencias absolutas en las medias de días fueron de -1,93 días (IC -3,92 a 0,06 días), como se muestra en el gráfico 14. En este caso, dado el Δ_2 que hemos utilizado para la variable injerto plaquetar no podemos demostrar la no inferioridad estadística del tratamiento que implicaba el procedimiento de depleción del DMSO con respecto al grupo en el que no se manipuló el injerto; para estudiar si el procedimiento de depleción del DMSO implica un número mayor de días de injerto plaquetar, comparamos ambos grupos en cuanto a esta variable utilizando el método T de student, y objetivamos la no existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p=0.06$) (gráfico 15).

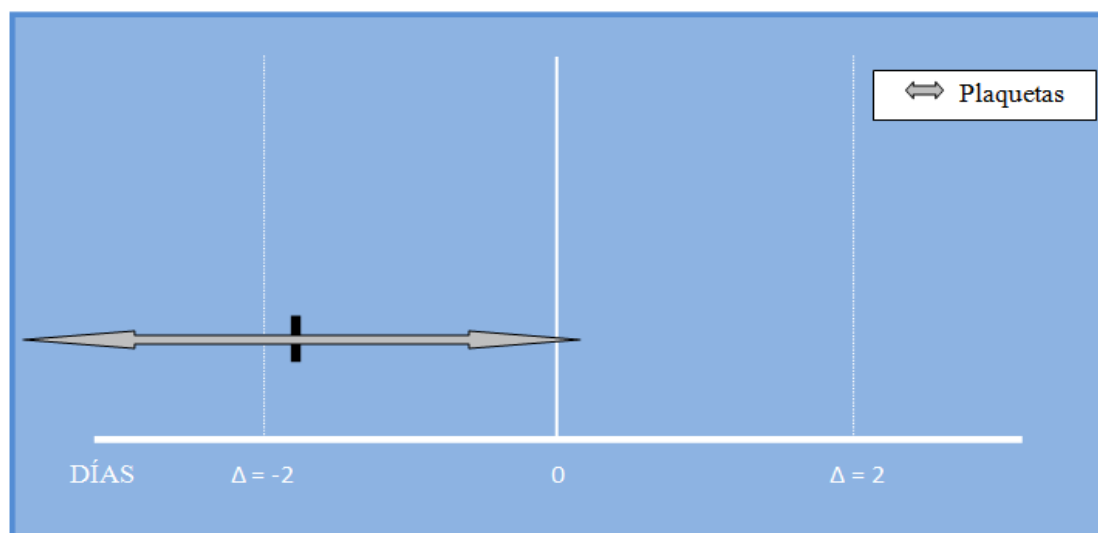


Gráfico 14. Intervalos de confianza 95% para la diferencia entre los grupos en cuanto al día de injerto plaquetar ($>20 \times 10^9/L$).

En términos actuariales, a las dos semanas del TPH el 90,47% de los pacientes del grupo no deplecionado y el 80,95% de los pacientes del grupo deplecionado presentaban más de $20 \times 10^9/L$ plaquetas, y al cabo de 21 días estas cifras eran del 99,41% y del 90,47% respectivamente. En el gráfico 15 se representa la cinética de recuperación plaquetaria y en la tabla 16 se muestra la distribución de los pacientes.

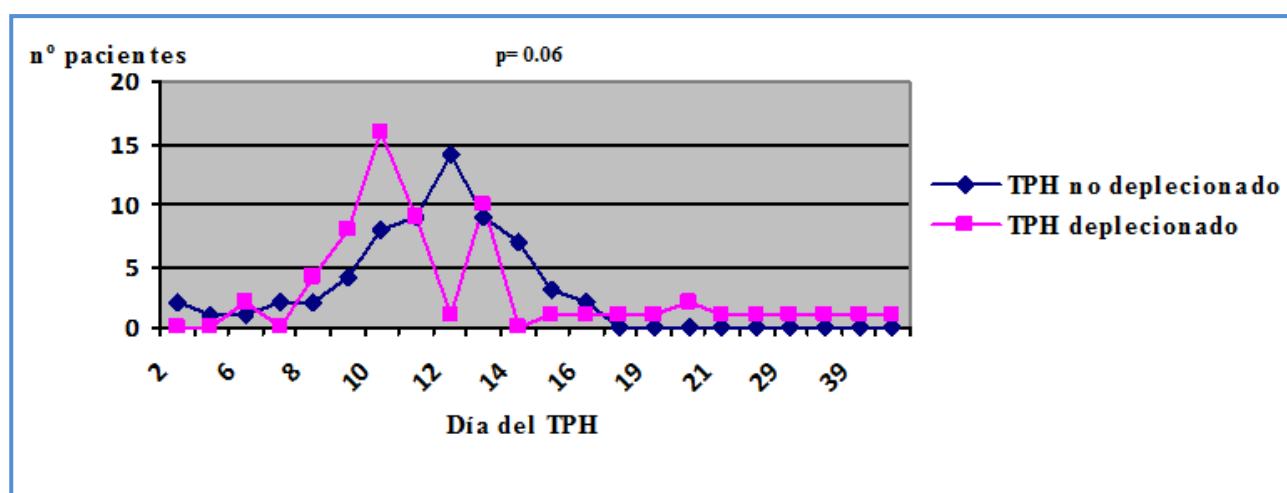


Gráfico 15. Día de injerto Plaquetario ($>20 \times 10^9/L$). TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

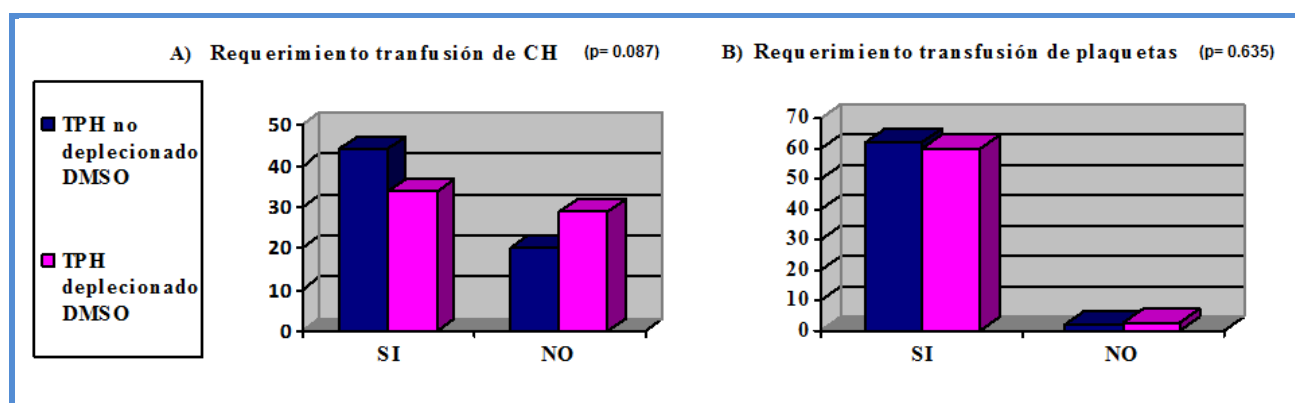
Tabla 16. Número de pacientes en los diferentes grupos del estudio, según el día de injerto de plaquetar ($>20 \times 10^9/L$).

Día injerto plaquetario	2	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	19	20	21	23	29	31	39	50
TPH sin depleción DMSO	2	1	1	2	2	4	8	9	14	9	7	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TPH con depleción DMSO	0	0	2	0	4	8	16	9	1	10	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1

III.2.4- Requerimientos transfusionales.

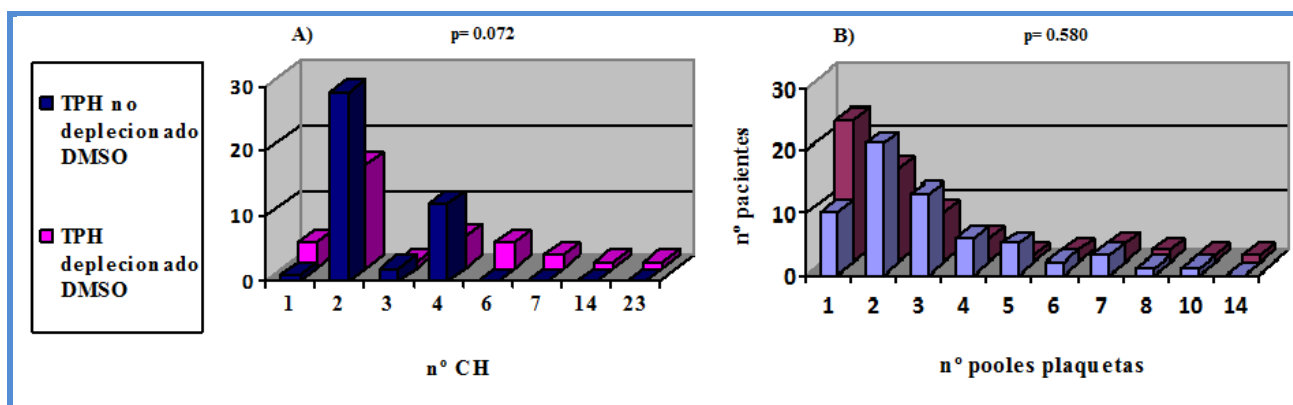
En el grupo control sin depleción de DMSO, el 31% de los pacientes ($n=20$), no precisaron transfusión de concentrado de hematíes durante el ingreso del TPH. Este porcentaje de pacientes sin necesidad de transfusión de hematíes durante el TPH fue superior en el grupo experimental con lavado de DMSO (45%, $n=29$), aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística ($p=0,087$).

En cuanto al soporte plaquetario, 62 de los 64 pacientes del grupo control sin depleción de DMSO precisaron transfusiones de concentrado de plaquetas, mientras que 61 de los 64 pacientes sometidos a TPH con PH lavados requirieron transfusiones de plaquetas, cifras estadísticamente similares ($p=0,635$) (gráficos 16A y 16B).



Gráficos 16. Distribución de la población según si precisaron de requerimientos transfusionales: **A)** Concentrados de hematíes. **B)** Pooles de plaquetas. **CH:** Concentrados de hematíes. **DMSO:** Dimetilsulfóxido. **TPH:** Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

La mediana de CH transfundidos fue de 2 (1-4) en el grupo de TPH no deplecionado y de 2 (1-23) en el grupo de TPH deplecionado ($p=0,072$); y la mediana de transfusión de pools de plaquetas fue de 2,5 (1-10) en el grupo de TPH no deplecionado y de 2 (1-14) en el grupo de TPH deplecionado ($p=0,58$) (gráficos 17A y 17B).



Gráficos 17. Distribución de los pacientes según: **A)** número de concentrados de hemáties recibidos. **B)** Pools de plaquetas recibidos. **CH:** Concentrados de hemáties. **DMSO:** Dimetilsulfóxido. **TPH:** Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

III.3- Días de fiebre y hospitalización.

Otras variables recogidas durante el estudio, con el fin de evaluar la funcionalidad de los PH infundidos tras el lavado del DMSO, fueron la aparición de episodios febriles y la duración de la hospitalización en el proceso del TPH.

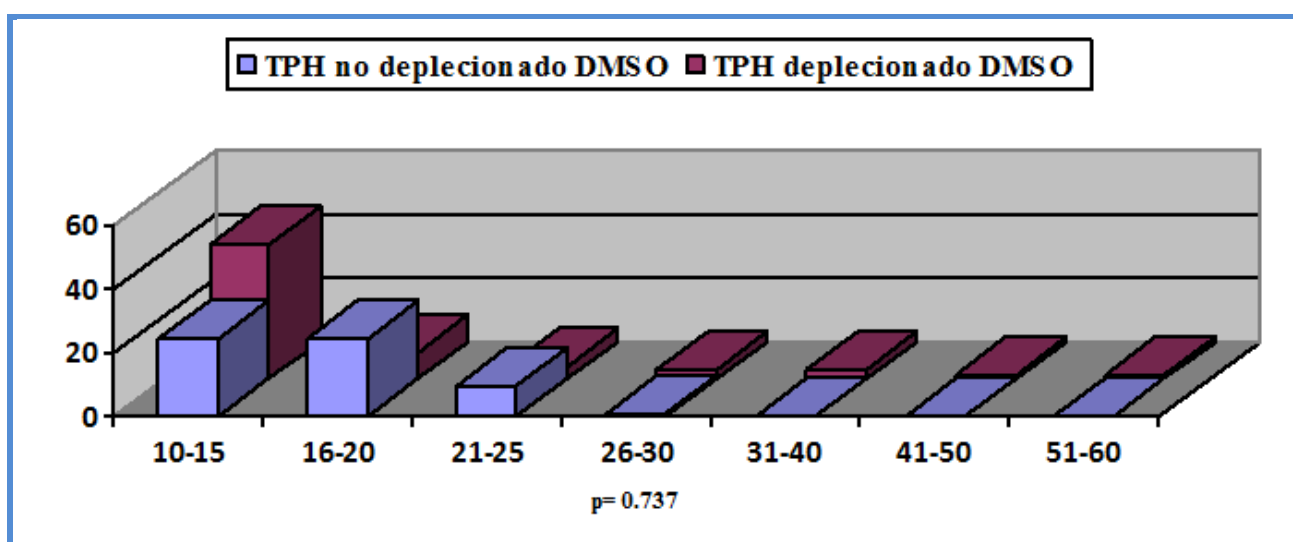


Gráfico 18. Distribución de la población según días de hospitalización. **DMSO:** Dimetilsulfóxido. **TPH:** Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

La estancia hospitalaria media de los pacientes desde el día 0 del TPH fue de 16,86 +/- 3,13 días en los TPH del grupo no deplecionado, y de 17,26 +/- 8,9 días en los TPH del grupo deplecionado ($p=0,737$) (gráfico 18 y tabla 17).

Tabla 17. Número de pacientes en los diferentes grupos del estudio, según los intervalos de días de hospitalización tras TASPE.

Días de hospitalización	10-15	16-20	21-25	26-30	31-40	41-50	51-60
TPH sin depleción DMSO	25	25	10	1	0	0	0
TPH con depleción DMSO	42	8	4	3	3	1	1

EL 84,37% (54 de 64) de los pacientes del grupo control no deplecionado de DMSO presentaron fiebre durante su estancia hospitalaria, con una media de $3,23 \pm 2,98$ días de fiebre (gráfico 19). En el grupo de pacientes sometido a TPH deplecionado de DMSO presentaron fiebre 30 de 63 pacientes (47,62%), con una media de días de fiebre de $1,43 \pm 2,24$. Tanto el número de episodios febriles ($p<0,001$), como la duración de la fiebre ($p=0,0002$), fue significativamente menor en el grupo de pacientes sometido a TPH deplecionado de DMSO (gráfico 19).

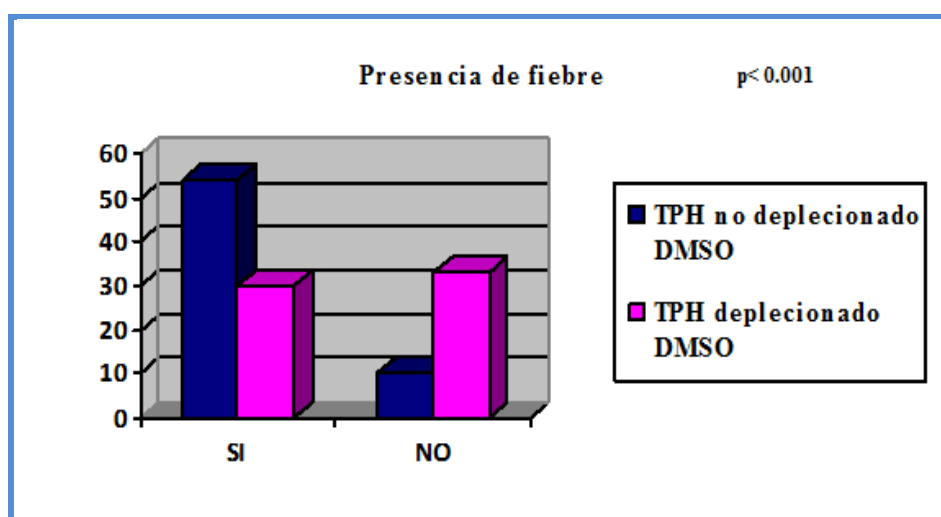


Gráfico 19. Distribución de la incidencia de fiebre durante el TPH. DMSO: Dimetilsulfóxido. TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

En el gráfico 20 y en la tabla 18 se representa la distribución de los pacientes según los días de fiebre y en función de los grupos a estudio.

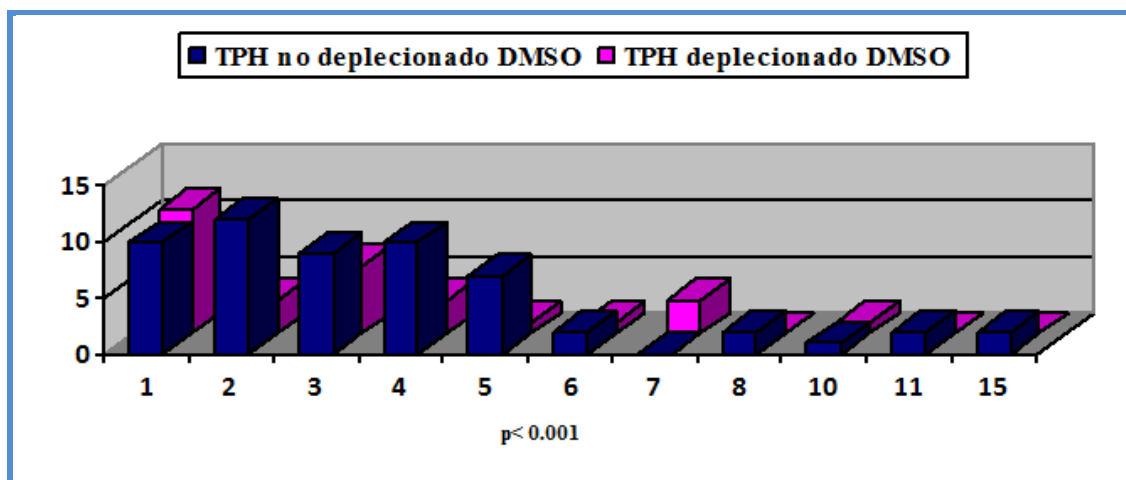


Gráfico 20. Distribución de la población según días de fiebre. **DMSO:** Dimetilsulfóxido. **TPH:** Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Tabla 18. Número de pacientes en los diferentes grupos del estudio, según la duración de la fiebre (días) durante la hospitalización durante el TASPE.

Días de fiebre	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	15
TPH sin depleción DMSO	10	12	9	10	7	2	0	2	1	2	2
TPH con depleción DMSO	11	3	6	3	1	1	3	0	1	0	0

En la tabla 19 se resume los resultados de los aislamientos microbiológicos identificados en los pacientes con episodios febriles. Los cultivos positivos en los pacientes febriles de grupo sin depleción fueron los siguientes: 8 *Staphylococcus* (*hominis*: 3, *epidermidis*: 2, *haemolyticus*: 2, *coagulasa negativo*: 1); 2 *Enterococcus faecium*, 1 *Corynebacterium sp*, 3 Bacilos gram negativos (*Escherichia coli*: 1, *Pseudomonas aeruginosa*: 1 y *Stenotrophomonas maltophilia*: 1); y 2 *Campylobacter jejuni* en heces. En el grupo de TPH con depleción del DMSO los cultivos positivos de los pacientes febriles correspondieron a: 3 *Staphylococcus* (*epidermidis*: 2, *haemolyticus*: 1); 3 *Enterococcus faecium*, 1 *Pseudomonas aeruginosa* y 5 infecciones por CMV (1 neumonitis y 4 reactivaciones).

Tabla 19. Relación de aislamientos microbiológicos en pacientes con episodios febriles sometidos a TPH.

Aislamientos microbiológicos			
TPH no deplecionados de DMSO		TPH deplecionados de DMSO	
Código TPH	Microorganismo	Código TPH	Microorganismo
153	<i>Staphylococcus hominis</i>	224	Reactivaciones CMV
167	<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>	238	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
176	<i>Campylobacter jejuni</i> en heces	241	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
177	<i>Staphylococcus hominis</i>	253	Neumonitis por CMV
180	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	258	Reactivaciones CMV
187	<i>Escherichia coli</i>	261	Reactivaciones CMV
190	<i>Campylobacter jejuni</i> en heces	265	Reactivaciones CMV
191	<i>Corynebacterium sp</i>	267	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
193	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	278	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
195	<i>Enterococcus faecium</i>	280	<i>Enterococcus faecium</i>
196	<i>Staphylococcus hominis</i>	286	<i>Enterococcus faecium</i>
197	<i>Enterococcus faecium</i>	289	<i>Enterococcus faecium</i>
198	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
199	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>		
203	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>		
232	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

DMSO: Dimetilsulfóxido. **TPH:** Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Cabe resaltar que tan sólo en un paciente correspondiente al grupo de TPH sin depleción, que presentó fiebre durante su hospitalización, la documentación del microorganismo aislado

en el proceso febril, coincidió con el microorganismo aislado en el cultivo de control realizado al inóculo antes de su infusión.

DISCUSIÓN

El trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica constituye hoy en día un procedimiento terapéutico ampliamente utilizado, con ciertas indicaciones sólidamente establecidas y muchas otras donde su uso está siendo evaluado de forma experimental^[10]. La constatación preliminar del beneficio clínico que podía aportar al paciente y de sus potenciales ventajas sobre otras técnicas de trasplante hematopoyético llevó a la generalización de su uso a principios de la década de los 90^[10]. Se puede afirmar que la inclusión de este procedimiento en el arsenal terapéutico diario ha precedido al conocimiento en profundidad de ciertos aspectos biológicos, metodológicos y clínicos relevantes para garantizar el resultado del trasplante^[10].

Entre los conocimientos biológicos y metodológicos que han facilitado el éxito del trasplante en la práctica clínica se incluyen la importancia de infundir un mínimo de 2×10^6 células CD34+/Kg del receptor para asegurar injerto de los PH^[255], y el manejo apropiado de las técnicas de criopreservación para mantener viables los PH mientras se realiza el acondicionamiento, o hasta que sean clínicamente necesarios^[231]. Merced a los conocimientos en criobiología ha sido posible identificar moléculas crioprotectoras como el DMSO, que a concentraciones entre el 5 - 10%, permiten una excelente viabilidad de los progenitores y su criopreservación por largos periodos de tiempo^[231]. Pese a su uso generalizado y de tener un adecuado balance riesgo-beneficio, el DMSO dista de ser una sustancia ideal para la clínica humana ya que debido a sus propiedades químicas tiene efectos secundarios relevantes, que contribuyen a la morbi-mortalidad precoz del trasplante^[231]. Por tal motivo se investigan nuevas moléculas, pero dado el excelente rendimiento crioprotector del DMSO y la amplia experiencia de su utilización en el TPH, se han propuesto otras alternativas para eliminar los efectos tóxicos del DMSO, como intentar retirarlo mediante el lavado de los PHSP tras su descongelación y antes de su infusión al paciente^[136].

Se han publicado algunos estudios en relación a la efectividad y seguridad de la eliminación del DMSO del producto de PH criopreservados^[181;228;237-239;256-261]. Muchos de estos estudios coinciden en destacar que con el lavado se puede retirar un elevado porcentaje de DMSO y de restos celulares,

pero también en que existe un porcentaje variable de pérdida de células CD34+. Por otro lado, la mayoría de los trabajos son en fase preclínica, y no utilizan procedimientos de lavado automatizados ^[228;238;239;256;257;259-261].

Existe muy poca experiencia de la seguridad y eficacia del trasplante autólogo realizado con PHSP lavados para eliminar el DMSO ^[256;261].

Nuestra hipótesis de trabajo, basada en los datos expuestos previamente, es que la depleción del DMSO de los PH infundidos en el TASPE es beneficiosa para los pacientes al disminuir la toxicidad sin disminuir la eficacia, cuando se emplea una técnica automatizada y cerrada con un procesador como el Sepax[®] S-100. Para confirmarla realizamos un estudio biológico comparativo de las características del inóculo celular antes y después del lavado con este procedimiento, y un estudio clínico de una serie de 64 pacientes consecutivos sometidos a TASPE con PH deplecionados de DMSO, cuyas características se compararon con un control histórico de pacientes trasplantados con PH sin deplecionar de DMSO.

En nuestro conocimiento, no existe ningún estudio en el que se haya utilizado el sistema automático cerrado con el procesador Sepax[®] S-100 para la depleción de DMSO y su aplicación clínica en pacientes sometidos a TASPE.

A continuación discutiremos los hallazgos de nuestro estudio siguiendo el orden de los apartados de los resultados.

I. Estudio de la homogeneidad de los dos grupos de trasplantes, con y sin depleción de dimetilsulfóxido.

I.1- Estudio de la homogeneidad de las características de los pacientes en los dos grupos.

El grupo experimental estaba formado por 64 pacientes trasplantados de forma consecutiva entre Septiembre del 2008 y Diciembre del 2010, en los que se utilizó el sistema automatizado cerrado para la depleción de DMSO de los PHSP criopreservados antes de su infusión. El grupo control histórico estaba formado por 64 pacientes consecutivos sometidos a TASPE sin

deplecionar de DMSO entre Noviembre de 2004 y Agosto del 2008. Todos los pacientes de esta serie fueron sometidos a TASPE por el mismo equipo clínico del programa de TPH del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia, utilizando los mismos protocolos de trabajo autorizados por los comités hospitalarios correspondientes. Todo ello contribuye a minimizar el riesgo de un sesgo de selección y dado su carácter de estudio observacional, las características del tratamiento administrado no se han modificado en función de los objetivos científicos del estudio.

Al tratarse de un estudio observacional, nuestra serie presentó algunos desbalances entre los grupos, como el número de líneas de tratamiento recibidos. Sin embargo, en el resto de las variables relevantes estudiadas como la edad, el sexo, la enfermedad de base, o el número de aféresis realizadas para obtener más de 2 millones de células CD34+/Kg, los grupos de estudio mostraron una gran homogeneidad.

Conviene destacar que nuestro estudio es el único en el que se utiliza el sistema automático cerrado Sepax[®] S-100 para deplecionar el DMSO de PHSP aplicado a pacientes sometidos a TASPE. Los estudios de depleción de DMSO publicados previamente en la literatura utilizan métodos manuales de centrifugación para la depleción del DMSO^[136;256;258] o un procesador celular distinto al nuestro^[228;238] (Cytomate[®], por ejemplo). Existen tres trabajos en los que utilizó el procesador celular Sepax[®] S-100, pero con un objetivo diferente, el de reducir volumen del producto recolectado de PH para su posterior criopreservación^[239;260;261].

I.1- Estudio comparativo de las características de los productos celulares, tras la descongelación, entre los grupos de trasplante de progenitores hematopoyéticos con y sin depleción de DMSO.

En nuestra serie también se observó homogeneidad en muchas de las características de los productos celulares tras la descongelación, como la cifra de CT, de células CD34+, y el número

de progenitores eritroides y megacariocíticos. Sin embargo, la viabilidad celular y las UFC-GM fueron significativamente inferiores en el grupo con depleción de DMSO (82% vs 74% $p < 0,001$ y $101 \times 10^4/\text{Kg}$ vs $76 \times 10^4/\text{Kg}$ $p = 0,028$ respectivamente), aunque este hecho no se tradujo en diferencias en cuanto a eficiencia clínica entre ambos grupos.

II. Estudio de los efectos del procedimiento de lavado para la depleción de dimetilsulfóxido sobre los progenitores hematopoyéticos.

Como se ha comentado en la metodología, la criopreservación de los PH es un paso necesario para la realización de los trasplantes autólogos. Ello implica la manipulación “in vitro” de los PH recolectados para su congelación y almacenamiento a temperaturas de -196°C , y la descongelación y reinfusión en el momento del trasplante. Es conocido que todos estos procesos contribuyen a disminuir el número de células y su viabilidad, reduciéndose ambos parámetros respecto a los valores precongelación^[255]. En consecuencia, la pérdida celular durante la criopreservación y las manipulaciones posteriores hace que el número de PH en el producto infundido sea menor que el número de células congeladas^[255;262-264].

Aunque existe un acuerdo general para considerar la cifra de al menos 2×10^6 células CD34+, como la adecuada para asegurar el injerto en un tiempo razonable, realmente no se conoce la cifra mínima de células CD34+ necesarias para conseguir el injerto, ya que en la práctica, se han realizado trasplantes con éxito infundiendo cifras entre uno y dos millones, e incluso con menos de un millón de células CD34+/Kg, aunque ello puede suponer un retraso sustancial en el tiempo de reconstitución hematopoyética. Por otro lado, las dosis dintel de células CD34+/Kg peso del receptor consideradas en estas recomendaciones son las obtenidas en los recuentos antes de la criopreservación, y es muy posible que estén sobrevaloradas. Así, en la práctica habitual, se tiende a considerar las cifras de los parámetros pre-congelación como las células infundidas, y

son pocos los estudios de calidad que se realizan en el material realmente infundido, es decir tras la descongelación celular^[255;262-264].

La implicación clínica de esta pérdida de PH dependerá de la extensión del daño celular originado durante la criopreservación, la descongelación y en nuestro caso la depleción del DMSO en el producto hematopoyético, y tendrá un impacto distinto según la fuente de PH, pues en el caso de la sangre de cordón umbilical, dado que la celularidad es baja, una pérdida significativa de células CD34+ podría dar lugar al fallo de implante del inóculo^[239;258;259].

Las técnicas de laboratorio para la tipificación y monitorización de los productos hematopoyéticos antes de su criopreservación incluyen el recuento de CT y de células CD34+ mediante el uso de contadores automáticos y CMF, así como viabilidad celular mediante el marcaje con 7-AAD o mediante la técnica de exclusión de azul de tripán, que, aunque menos exacta, es más rápida y económica.

Por tanto, para obtener información real sobre el estado de las células progenitoras después de la congelación, es preciso determinar el recuento y viabilidad del subconjunto de células CD34+ por citometría de flujo y sus características funcionales mediante ensayos in vitro de su capacidad clonogénica (ensayos UFC, cultivos clonogénicos). De esta manera, el recuento de colonias post-descongelación nos indica si nuestro injerto está o no en el rango de eficiencia clonogénica (nº CFU/nº CD34) esperada.

La optimización de las técnicas de control de calidad de los productos celulares descongelados permitiría establecer el impacto real de su manipulación sobre la recuperación de los PH antes de la infusión, así como la detección precoz de cualquier evento que pudiese comprometer la viabilidad y/o recuento celular. Además, el conocimiento de la dosis de células CD34+ viables en el momento de la infusión permitirá definir mejor las dosis mínimas y probablemente establecería umbrales menores a los actuales.

Los PH criopreservados deben ser descongelados para uso clínico, lo que implica que todo los cambios biológicos que se produzcan durante la congelación celular afectarán al producto descongelado. Las células descongeladas heredan una situación de hiperosmolaridad debida, principalmente, a la presencia del DMSO. Estos cambios de osmolaridad implican movimiento de solutos a través de las membranas citoplasmáticas dependientes de concentración (ósmosis, difusión), que pueden alterar su integridad^[174]. La hiperosmolaridad afecta negativamente a la recuperación de PH descongelados a partir de 60 minutos, y a la capacidad clonogénica de los injertos a partir de 90 minutos post-descongelación^[13]. Este es un "largo plazo" teniendo en cuenta que el tiempo necesario para el restablecimiento de la osmolaridad fisiológica, desde la descongelación hasta la infusión, se da en cuestión de minutos (15-40). En su estudio, Rodriguez y col.^[13] demuestran que pese a mantener los PH a 4°C, se produce una reducción significativa (60%) de la capacidad clonogénica y de la viabilidad de las células CD34+ en el plazo de una a dos horas post-descongelación si el DMSO está presente en la solución, mientras que la pérdida es aproximadamente la mitad (30%) si se elimina el crioprotector. Además, el resto de células del injerto, linfocitos, monocitos y granulocitos siguieron el mismo patrón. Estos y otros autores concluyen que la presencia del crioprotector es deletérea para los productos hematopoyéticos descongelados independientemente de la etiología del mecanismo responsable sea la toxicidad química del DMSO y/o la hiperosmolaridad *per sé*, y que el producto hematopoyético descongelado debería ser infundido lo antes posible si no se elimina el crioprotector^[13]. También sugieren que el tiempo máximo desde la descongelación hasta la infusión no debe sobrepasar el límite de seguridad de los 90 minutos. Por tanto, no sólo es importante el beneficio de la depleción del DMSO en cuanto a la disminución de la aparición de los efectos secundarios asociados a la infusión, sino porque los PH no se verán afectados tras la descongelación por la hiperosmolaridad y el efecto deletéreo del DMSO en la viabilidad celular^[13]. Por todo ello, es una práctica generalmente admitida la infusión rápida de los PH tras su descongelación^[13]. En

nuestro trabajo, en el grupo control la infusión se realizó en menos de 20 minutos tras la descongelación de los PH, mientras que en el grupo experimental se procedió a la estabilización de la osmolaridad con la solución de lavado (suero salino, ACD-A y albúmina) y la consiguiente depleción del DMSO antes de la infusión del inóculo.

II.1- Estudio de la eficacia del procedimiento de lavado celular para la depleción de dimetilsulfóxido.

La eliminación del DMSO para mejorar la infusión de progenitores criopreservados no es una nueva estrategia^[236;265] para reducir la toxicidad del TPH. Se han propuesto diversas técnicas que van desde la utilización de menos concentración de DMSO en la mezcla de congelación, la congelación de productos altamente concentrados y la selección celular precongelación, hasta el lavado manual del producto descongelado^[230;231;235]. Estos métodos han resultado en una eliminación insuficiente del crioprotector como para abolir la morbilidad asociada a su infusión y poco o nada eficientes en lo que se refiere a la eliminación de restos celulares. Menichella y col.^[266], utilizaron como métodos para eliminar glóbulos rojos hemolizados, granulocitos, agregados plaquetarios y DMSO, un proceso de centrifugación y sedimentación utilizando hidroxietilalmidón y un sistema semiautomático mediante un procesador celular sanguíneo, documentando una recuperación tanto de CMN como de CT superior al 80% con ambos métodos, no así con las UFC-GM con el sistema semiautomático, en las que la recuperación fue menor del 40%^[266], mientras en nuestro estudio la recuperación de CN fue del 72% y del 157% en las UFC-GM, si bien no es comparable con estos trabajos, pues en nuestro caso utilizamos un proceso automático y una solución de lavado diferente (salino, ACD-A y albúmina).

La evaluación preclínica de dos sistemas automáticos de lavado (Sepax[®], Cytomate[®]) de productos hematopoyéticos descongelados mostró, de forma reproducible, una eliminación del 98% del DMSO sin contaminación microbiológica y una pérdida de progenitores y de

capacidad clonogénica irrelevantes después del proceso^[228;238;239;259]. Adicionalmente, como estos procesadores celulares funcionan en sistemas cerrados, una potencial pérdida celular podría haber sido revertida mediante un nuevo procesamiento de la bolsa de desecho.

Se han publicado los datos de varios estudios con diferentes sistemas de lavado de DMSO, manual, semiautomático y automático, en los que se indica el grado de eficacia del procedimiento y las pérdidas de células durante el proceso. En la tabla 20 se resumen los datos más relevantes de estas publicaciones en comparación con los obtenidos en nuestro estudio. Como se refleja en la tabla 20, en nuestro estudio la recuperación de CN tras el lavado fue de un 72%, similar a lo publicado en el lavado de PHSP utilizando métodos manuales^[136] o los procesadores Sepax[®] S-100^[261], Cytomate[®]^[238] y Cobe[®] 2991^[237] que oscilaron entorno a un 89%; mientras que la recuperación de CN en el lavado de PH de SCU observada por otros autores utilizando método manual, Sepax[®] S-100 y Cytomate[®] en PH de SCU, las fue del 92%^[258], 89%^[239] y del 63%^[259] respectivamente.

La viabilidad celular de las muestras ya sometidas al proceso de depleción del DMSO en nuestro trabajo fue del 74% en células totales, en concordancia con el 73% reportado por Rodriguez y col.^[238] en la depleción del DMSO con procesador Cytomate[®] en PHSP (tabla 20). Este porcentaje fue menor que el publicado por Perotti y col.^[259] con el Cytomate[®] para PH de SCU (89%) o por Zinno y col.^[261] utilizando nuestro mismo procesador en PHSP (98%), pero con el propósito de reducir volumen y por tanto sin que los PHSP estuviesen expuestos al proceso de la criopreservación. Aunque este último estudio no es por tanto comparable al nuestro, si es interesante desde el punto de vista de la inocuidad del procedimiento respecto a la viabilidad celular.

En nuestro estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de células CD34+, en las UFC-Meg ni en la viabilidad celular al comparar los valores antes y después del lavado. Sin embargo, las células totales disminuían tras el procedimiento

del lavado comparadas con las pre-lavado (pérdida de un 28%) probablemente como consecuencia de la pérdida de granulocitos, tal como se describe en otros trabajos^[239]. Paralelamente hubo un incremento en la cantidad de UFC-GM y BFU-E tras el lavado de DMSO, que también ha sido observado en otros estudios^[216;238], y que es atribuible a la toxicidad del DMSO sobre las colonias granulomacrofágicas y eritroides (aunque no constan datos de éstas últimas en otros estudios). Reich-Slotky y *col.*^[264] publicaron que como consecuencia de la diferente composición de la membrana celular y un mayor volumen osmótico inactivo, las células CD34+ están mejor protegidas frente al choque osmótico y a la formación de cristales de hielo, y son por lo tanto más resistentes a los daños producidos por la criopreservación comparadas con el resto de poblaciones celulares. Estos autores demostraron que la viabilidad celular CD34+ tras el proceso de criopreservación no se correlaciona con la viabilidad de las CT medidas por azul de tripán, al reducirse ésta última en más de un 25%, principalmente debido a la pérdida de los granulocitos^[264]. Otra explicación sería el posible choque osmótico producido durante el lavado celular pues en varios trabajos^[137;259] no se equilibraron osmóticamente las muestras descongeladas antes de diluirlas directamente en medios isotónicos. Sin embargo en otros estudios como el de Beaujean y *col.*^[237] sí se cuidó el equilibrio osmótico utilizando albúmina en la solución de lavado, o el estudio de Rodriguez y *col.*^[239], con solución de dextrano-albúmina, y nuestro estudio con ACD-albúmina.

Las recuperaciones de células CD34+ obtenidas en nuestra serie tras la depleción de DMSO mediante este sistema automático cerrado fue del 101%, muy similares a los resultados obtenidos para PHSP con el procesador celular Cytomate[®] por Calmels y *col.*^[228] con un 99%, y por Rodriguez y *col.*^[238] con un 103%, todos ellos superiores a los conseguidos con el método manual en PHSP (65%)^[136].

La incorporación del lavado celular de los PH al procedimiento del trasplante, comparada con la infusión directa de los PH tras su descongelación, consume tiempo y reactivos. Los

procesos de lavado reportados consumieron una media de 20-30 minutos por bolsa de aféresis procesada (tiempo reducido si se compara con el método manual que necesita 40 minutos de promedio^[261]). Sin embargo, si su utilización se traduce en menos reacciones adversas asociadas a la infusión y menos tratamientos y tiempos de cuidados, esta técnica podría ser costo-eficaz y por tanto debería recomendarse su uso rutinario en el TPH de productos criopreservados. Adicionalmente, como el producto resultante del lavado celular se encuentra en una osmolaridad citoplasmática, esta técnica podría presentar una ventaja adicional en la recuperación hematológica.

II.2- Estudio de la seguridad del procedimiento de lavado para depleción de dimetilsulfóxido.

Como previamente se ha comentado, en todo procedimiento de manipulación celular en el laboratorio, pese a las medidas asépticas realizadas, existe riesgo de que se produzca contaminación bacteriana, lo que en el TASPE es de la mayor trascendencia pues se trata de productos que con posterioridad son infundidos por vía venosa central en el torrente sanguíneo. En nuestro estudio, los aislamientos microbiológicos en las bolsas antes del procedimiento del lavado fueron del 4,79% y tras la manipulación los aislamientos fueron del 6,25% (no estadísticamente significativos), similares a los resultados publicados por Majado y *col.*^[267], que presentaron un 5% de aislamientos microbiológicos y algo superiores a los publicados por Smolyaninov y *col.*^[260], utilizando el mismo procesador automático, aunque estos autores tenían el objetivo de reducir el volumen de unidades de SCU. No observamos diferencias estadísticamente significativas en los aislamientos microbiológicos documentados antes y después del procedimiento de lavado para depleción de DMSO.

En cuanto a la identificación de los microorganismos aislados en nuestro estudio correspondieron en un 100% a bacterias gram positivas (probablemente procedentes de la piel)

en el grupo a estudio antes del procedimiento de lavado. Tras el lavado más del 85% fueron bacterias gram positivas (sólo se identificó un germen gram negativo de los 8 aislamientos documentados). Estos datos son similares a los obtenidos por Majado y *col.*^[267] en el que las bacterias gram positivas supusieron más del 95% de los aislamientos microbiológicos (sin existir manipulación posterior a la descongelación); no hemos encontrado otros trabajos publicados con datos de los aislamientos microbiológicos antes y después de los procesamientos de depleción de DMSO, o reducción de volumen del inóculo. Las posibles fuentes de estas bacterias incluyen la piel del paciente en el procedimiento de recolección, uso de reactivos contaminados (anticoagulantes,...), y la contaminación bacteriana durante el procedimiento de criopreservación.

III. Comparación de la seguridad y eficacia del trasplante de progenitores hematopoyéticos entre el grupo control y el grupo experimental.

III.1- Características del inóculo celular.

Los resultados de las variables que evalúan la eficacia del procedimiento del TPH teniendo en cuenta las características del inóculo infundido las podemos dividir en los siguientes apartados:

III.1.1- Composición celular del inóculo.

Según Syme y *col.*^[136], la calidad del producto del injerto autólogo se mide por la viabilidad de las células, el número de CT y el número de CD34+. En nuestro trabajo documentamos la ausencia de diferencias estadísticamente significativas comparando los productos infundidos de los dos grupos estudiados en cuanto al número de CD34+. Sin embargo las CT y la viabilidad celular fueron significativamente más altas en el grupo

control, sin depleción de DMSO. Esta pérdida significativa de CT sin que se reduzcan las células CD34+, han sido también documentadas en otros estudios a pesar de utilizar para la depleción de DMSO métodos manuales^[136;258] o automáticos^[237-239;259;261] con los procesadores celulares Cytomate[®]^[238;259] y Sepax[®] S-100^[239;261] sobre diferentes tipos de PH (MO^[237], SP^[136;237;238;261] o SCU^[239;258;259]), y se explica porque la pérdida celular se produce a expensas de los granulocitos^[239], ya que estas células son menos resistentes al daño ocasionado por la criopreservación que las células mononucleadas, y que las células CD34+^[228;238;258].

III.1.2- Unidades formadoras de colonias granulomacrofágicas, eritroides y megacariocíticas.

Basados en los estudios de viabilidad de las células de la médula ósea, Branch y *col.*, no encontraron toxicidad del DMSO sobre las UFC-GM hasta transcurridas 2 horas a 4°C^[215]. Por el contrario, otros autores^[216;238;268] comunicaron una pérdida de UFC-GM, más elevada cuanto mayor era el tiempo de exposición al DMSO tras la descongelación; en este contexto Rodríguez y *col.*^[238] observaron una rápida reducción de la viabilidad de las células CD34+ y de las colonias UFC-GM, con una recuperación del 50% en el grupo control en comparación con el 70% en el grupo de lavado 2 horas después del mismo.

Actualmente no está generalizado el estudio de los cultivos clonogénicos en las Unidades de Trasplante de PH, pero, en nuestra opinión, es un buen control de la funcionalidad de las células progenitoras, por ello investigamos mediante cultivos clonogénicos si el DMSO es tóxico para las células tras la descongelación. En nuestro estudio, el número de colonias UFC-GM, BFU-E y UFC-Meg por TASPE, cultivadas en el grupo control de TPH sin depleción de DMSO antes de la infusión fue similar al obtenido en el grupo experimental, tras el proceso de depleción de DMSO. Estos datos difieren de

los trabajos de Rodríguez y *col.*^[238], que utilizó para la depleción de DMSO el procesador automático Cytomate[®], en el que se observó una recuperación de UFC-GM mayor que el grupo control y una pérdida de UFC totales, pero sin alcanzar significación estadística. Por otro lado, Syme y *col.*^[136] con un método de depleción mediante centrifugación, observó una pérdida significativa de las UFC en cultivo (UFC-C) tras la depleción, pero no demostraron diferencias en las recuperaciones de las BFU-E ni para UFC-Meg. En nuestro trabajo la recuperación de las colonias UFC-GM fue del 157%, algo superior a los resultados publicados en la literatura que varían entre 116% obtenido por Zinno y *col.*^[261] utilizando el mismo procesador celular que el nuestro, el 63% obtenido por Calmels y *col.*^[228], y el 91% obtenido por Rodríguez y *col.*^[238] que utilizaron el sistema automático Cytomate[®]; y del 94% obtenido por Beajuean y *col.*^[237] utilizando el procesador celular Cobe[®] 2991 para PHSP. También fueron menores las recuperaciones de UFC-GM cuando las depleciones se realizaron con los procesadores Sepax[®] S-100 y Cytomate[®] para PH de SCU, siendo los resultados de 96%^[239] y 74%^[259] respectivamente.

Las recuperaciones para BFU-E y UFC-Meg en el grupo experimental tras la descongelación y lavado del DMSO fueron de 170% y 185% respectivamente, no existiendo referencias a la utilización de cultivos para este tipo de colonias en la literatura revisada.

III.2- Estudio de la seguridad del procedimiento de infusión del inóculo en el trasplante de progenitores hematopoyéticos.

III.2.1- Reacciones adversas durante la infusión de progenitores hematopoyéticos.

El otro gran problema que afecta a la infusión directa de los productos hematopoyéticos descongelados son los síntomas adversos asociados a la infusión de DMSO. La infusión

directa al paciente de PH descongelados es la técnica más utilizada en el TASPE por la baja probabilidad de contaminación, la ausencia de costes adicionales, el ahorro de tiempo y un menor riesgo de pérdida de progenitores asociados a las manipulaciones del producto descongelado. No obstante, la infusión directa de PH sin lavar implica no sólo la infusión de DMSO, sino también de restos celulares como los granulocitos y de hemoglobina libre, ocasionada por la lisis tanto de los hematíes como de los granulocitos, que son células menos resistentes a los procesos de congelación y descongelación^[138;139]. Estos factores parecen ser los responsables de la toxicidad asociada al TPH reportada en muchos pacientes^[219;220;225;269;270].

Algunos de los signos y síntomas clínicos asociados a la infusión de PH sin lavar pueden estar relacionados con la liberación de histamina inducida por DMSO^[219;238]. Así, se ha reportado que la ruborización, los dolores abdominales y la sensación de dificultad respiratoria pueden ser consecuencia de la liberación de este mediador y la premedicación con antihistamínicos no es suficientemente eficaz en muchos casos para eliminar estos síntomas^[137;269]. Adicionalmente otras complicaciones más graves como las alteraciones cardiovasculares y la toxicidad neurológica también han sido asociadas a la infusión del DMSO y detritus celulares de los PH sin lavar^[137;269]. Por tanto, la toxicidad asociada al trasplante podría ser multifactorial y la eliminación del DMSO y los restos celulares podrían disminuir la morbilidad durante y después de la infusión^[137;269]. Por último, no se puede despreciar el hecho de que una toxicidad aguda durante la infusión puede afectar a la tolerancia de un paciente a trasplantes posteriores^[13].

La toxicidad del DMSO durante la infusión es dosis dependiente^[136;219;220;225], en general se acepta un límite de 1g de crioprotector por Kg de peso del paciente en cada infusión como un umbral máximo de toxicidad. La eliminación del DMSO representa para los PHSP una optimización del estado celular a lo largo del tiempo así como una medida

para estabilizar osmóticamente el injerto antes de su infusión. La aparición de eventos adversos durante la infusión de PH sin lavar, intenta minimizarse mediante la administración previa de antihistamínicos, antipiréticos e incluso corticoides^[269].

En nuestro estudio, para evitar sesgos tanto para el grupo de TPH sin depleción de DMSO como para en el grupo experimental se administró como premedicación actocortina 100 mg iv, paracetamol 1 g iv y dexclorfeniramina 5 mg iv (o dosis equivalentes pediátricas).

En el caso de un TASPE, el enriquecimiento de células mononucleadas mediante técnicas de separación adicionales o el lavado de los PH antes de la infusión para eliminar el DMSO, sería beneficioso y podría reducir o eliminar la toxicidad asociada al TPH en pacientes frágiles, sin necesidad de recurrir a la infusión en días consecutivos^[230;233]. En este sentido se han realizado infusiones fraccionadas del volumen total de injerto^[233], se ha lavado el DMSO del injerto de forma manual mediante centrifugación^[136;236;256], y más recientemente se han utilizado métodos automáticos con procesadores celulares como Cytomate[®]. En todos estos trabajos se reportó una reducción de los eventos adversos de forma significativa (Calmels y col.^[137] presentaron 13,5% y, Syme y col.^[136] una reducción importante al comparar un grupo de PH con DMSO frente a un grupo con depleción de DMSO), a excepción del trabajo de Córdoba y col.^[138], en el que presentaron un 67% de eventos adversos, aunque la mayoría de ellos fueron de grado 1-2.

En nuestro estudio en el grupo de TPH con depleción de DMSO se infundieron 144 bolsas sin documentarse reacción adversa alguna. En contraste, en el grupo de TPH sin depleción de DMSO se documentaron reacciones adversas en 33 pacientes (51,6%), no siendo infrecuente la aparición de más de una de ellas en un mismo enfermo.

Las reacciones adversas más frecuentes fueron: flush facial o exantema (32% de las reacciones adversas), opresión torácica (23%), disgeusia (11%), náuseas (11%), dolor

abdominal (11%), hipoxia (9%), bradicardia (5%), cefalea (3,5%), taquicardia (1,8%) y disnea (1,8%). Los efectos adversos observados en nuestros pacientes son inferiores a los publicadas en la literatura. En otros trabajos las toxicidades más comunes son las náuseas (45%)^[219;269;270], vómitos (24%), escalofríos (31%) y fiebre (18%)^[219;270] y molestias abdominales^[269]. Davis y col.^[219;269], comunicaron bloqueos cardíacos de segundo grado y bradicardia asintomática (29%)^[219;220;270], hipertensión arterial (36%)^[219;220;225;270], y molestias torácicas tipo opresión (1,3%)^[219;237] cuya patogénesis no está clara pues aparte del DMSO otros autores la atribuyen a productos de la lisis celular, la hipotermia del producto infundido que puede inducir respuestas vagales^[225], anomalías electrolíticas (sistémicas o locales)^[220] o a la expansión aguda de volumen^[219;220;225;270], e hipotensión transitoria^[270]. Davis y col.^[270], documentaron disnea leve; Kessinger y col.^[219], objetivaron una alta incidencia de insuficiencia renal probablemente secundaria a injertos con alta contaminación con glóbulos rojos, menos comúnmente se han descrito reacción anafiláctica^[269], hemólisis intravascular^[271], daño hepático^[271] y daño del SNC con obnubilación y convulsiones^[225;271], e incluso la muerte, durante o inmediatamente después de la infusión de PH criopreservados^[220]. La insuficiencia renal es un factor favorecedor en la aparición de eventos adversos relacionados con la infusión de PH criopreservados por una excreción de DMSO y sus metabolitos más retardada^[225]. En nuestro estudio no se observaron reacciones adversas graves en el grupo de TPH sin depleción de DMSO, y siendo todas ellas reversibles con tratamiento sintomático.

III.2.2- Contaminación bacteriana.

Durante el procedimiento de recolección, criopreservación y depleción del DMSO, a pesar de las medidas de esterilidad adoptadas para la manipulación de PH, existe riesgo de contaminación bacteriana. En nuestro estudio la incidencia de contaminación bacteriana

fue del 9,3% en el grupo control y del 4,79% en el grupo del lavado del DMSO antes de la depleción y del 6.25% tras la depleción. Esta incidencia es inferior a la incidencia del 12,7% publicada por Stroncek y *col.*^[201], a pesar de que ellos usaban antibióticos en los PHMO cultivados, y es similar al 5% reportado por Majado y *col.*^[267] en PHSP, cuya incidencia y a los datos publicados por Rodriguez y *col.*^[260] utilizando el sistema Sepax[®] para reducción de volumen en unidades de SCU (2,9%). Las posibles fuentes de estas bacterias incluyen la piel del paciente, que se produzca bacteriemia en el momento de la recolección, el uso de reactivos contaminados (anticoagulantes,...), y la contaminación bacteriana durante el procedimiento de recolección y criopreservación, así como el uso de métodos manuales y el uso de sistemas abiertos para la depleción de DMSO^[267]. El uso de los nuevos sistemas disponibles en el mercado para la recogida de PH que requieren menor manipulación, y el uso de separadores automatizados para aislar células mononucleadas y para el lavado del DMSO han reducido la incidencia de contaminación bacteriana, como ha sucedido en nuestro estudio al utilizar un sistema de lavado cerrado, que no incrementó la tasa de contaminación bacteriana. Entre los microorganismos documentados en nuestro caso sólo se aisló una bacteria gram negativa en el grupo control (1/17) y una en el grupo experimental tras el proceso de lavado (1/9). También habría que destacar la menor incidencia de éstos microorganismos frente a los microorganismos gram positivos, como ocurre en los trabajos de Majado y *col.*^[267] (1 microorganismo gram negativo de los 17 inóculos de PHSP contaminados con bacterias infundidos a pacientes) y de Stroncek y *col.*^[270] (6 microorganismos gram negativos de los 17 inóculos de PHMO contaminados con bacterias).

III.2.3- Tiempos de injerto leucocitario y plaquetar.

El estándar de oro de la calidad del inóculo viene dado por el tiempo hasta el injerto hematopoyético^[136]. No está del todo claro si el lavado de DMSO después de la descongelación afecta a la cinética injerto. Se ha investigado el papel del DMSO en la cinética del injerto en estudios clínicos de pacientes sometidos a TPH de SCU^[265] y PHSP^[232]. En este último se comparó la cinética diferencial del injerto de PH entre un inóculo con 10% de DMSO y un inóculo con una mezcla de DMSO 5% e hidroxietilalmidón al 6%, observándose un injerto de leucocitos y de neutrófilos más rápido en el grupo con menos DMSO^[232].

Nuestro estudio fue diseñado para evaluar si se podría eliminar el DMSO de los PH sin afectar el tiempo al injerto hematopoyético después del TPH.

Como se observa en la tabla 13, nuestros datos demuestran que la recuperación hematopoyética fue similar entre los dos grupos del estudio, tanto en el tiempo al injerto de leucocitos superior a $0,5 \times 10^9/L$ (media de 10 días en ambos grupos), como en el tiempo al injerto de neutrófilos superior a $0,5 \times 10^9/L$ (media de 11 días para los dos grupos) lo que confirma la *no inferioridad* del procedimiento. Estos resultados son discretamente mejores a los publicados por Syme y col.^[136], que reportaron un tiempo al injerto de leucocitos de 12 días para el grupo que recibió PH sin depleción de DMSO y de 11 días para el grupo que recibió PH con depleción del DMSO respectivamente y un tiempo al injerto de neutrófilos de 13 *versus* 12 días. Sin embargo, el tiempo al injerto de plaquetas mayor que $20 \times 10^9/L$ fue más tardío en el grupo sometido a la depleción de DMSO (media de 13 días *versus* 11 días en el grupo control), sin poder demostrar la no inferioridad estadística de este procedimiento; pero al estudiar si el procedimiento de depleción del DMSO implicaba un número mayor de días de injerto plaquetar, objetivamos la no existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. Estos resultados son diferentes de los

obtenidos por Syme y col.^[136], que reportaron un tiempo al injerto de plaquetas de 11 días en el grupo sin depleción de DMSO *versus* 12 días en el grupo con depleción. A diferencia de nuestro trabajo, en este estudio se utilizó una solución de lavado con suero salino junto a solución de citrato dextrosa y un sistema automático diferente (Cytomate[®]).

III.2.4- Requerimientos transfusionales.

La transfusión de hemoderivados es un soporte necesario en el periodo de aplasia medular hasta que se produce el injerto, por lo que es un buen indicador de la seguridad del mismo. Este es un parámetro que no está descrito en la mayoría de los trabajos publicados^[136], pero que consideramos importante como índice de la calidad del inóculo.

La mediana de concentrados de hematíes transfundidos por paciente en el 69% de los pacientes que lo precisaron en el grupo control, y en el 55% de los pacientes del grupo experimental que lo precisaron fue de 2 concentrados de hematíes en ambos grupos (no diferencias). De igual modo, la mediana de pools de plaquetas transfundidos en aquellos pacientes que precisaron transfusión plaquetaria tampoco mostró diferencias entre ambos grupos (2,5 y 2 para grupo control y grupo experimental respectivamente), indicando que la depleción del DMSO no tuvo impacto en los requerimientos transfusionales. Nuestros resultados coinciden con el estudio publicado por Syme y col.^[136] en el que incluyeron 56 pacientes sometidos a TASPE (21 pacientes a los que se infundieron los PHSP con DMSO y 35 pacientes en los cuales se procedió a la depleción del DMSO mediante lavado y posterior centrifugado manual); en este estudio no se encontraron diferencias en el número de componentes transfundidos tanto para CH (media de 2,7 en el grupo control y 2 en el grupo a estudio, incluyendo aquellos pacientes que no precisaron transfusiones) como para unidades de plaquetas (1,7 vs 1,9 respectivamente).

Tabla 20. Resultados del uso de diferentes métodos de depleción de DMSO en trabajos revisados y en nuestro estudio.

Autores	Año publicación	Método lavado DMSO	Tipo PH	Número procedimientos (n)	Recuperación CN (%)	Recuperación UFC-GM (%)	Recuperación CD34+ (%)	Viabilidad celular total (%)
Beaujean y col. ^[237]	1991	Cobe [®] 2991	MO	50	80.8	73.9	-	-
			SP	12	89	93.9	-	-
Calmels y col. ^[228]	2003	Cytomate [®]	SP	39	-	63	99	78 (en CD34+)
Perotti y col. ^[259]	2005	Cytomate [®]	SCU	25	63	74.3	70.2	89
Rodriguez y col. ^[238]	2005	Cytomate [®]	SP	15	89	91	103	73
Rodriguez y col. ^[239]	2004	Sepax [®] S-100	SCU	20	89	96	94	94 (en CD34+)
Zinno y col. ^[261]	2011	Sepax [®] S-100	SP	104	89	116	90.5	98
Laroche y col. ^[258]	2004	Manual	SCU	10	92	379	173	87
Syme y col. ^[136]	2004	Manual	SP	35	-	-	65	>80
Sánchez-Salinas	2012	Sepax [®] S-100	SP	167	72	157	101	74

CN: células nucleadas. **DMSO:** dimetilsulfóxido. **MO:** médula ósea. **PH:** progenitores hematopoyéticos. **SCU:** sangre de cordón umbilical. **SP:** sangre periférica. **UFC-GM:** unidades formadoras de colonias granulomacrofágicas.

III.4- Días de fiebre y hospitalización.

Otros parámetros clínicos relevantes en el TPH, tanto por su impacto en la calidad de vida de los pacientes como en el de su impacto económico, son los días de hospitalización y de fiebre tras el TPH.

Un 84% de los pacientes sometidos a TPH en el grupo control no deplecionado presentaron algún episodio febril durante su estancia hospitalaria con una media de 3 días de fiebre (gráfico 16). En contraste, sólo un 48% de los pacientes del grupo de TPH deplecionado de DMSO presentaron fiebre, con una media de menos de 2 días febriles, lo que representa unas diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos, tanto en la incidencia como en la duración de la fiebre experimental. Con todo, esta diferencia está probablemente relacionada con la introducción de la antibioticoterapia anticipada de amplio espectro a partir del año 2007, más que con el procedimiento de depleción de DMSO.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en la duración de la estancia hospitalaria de los pacientes.

Es interesante constatar que tan sólo en un paciente del grupo de TPH sin depleción, que presentó fiebre durante su hospitalización, se documentara un microorganismo que coincidió con el microorganismo aislado en el cultivo de control realizado al inóculo antes de su infusión, de forma similar a lo ocurrido en el estudio de Stroncek y *col.*^[270]. La razón de que la infusión de inóculos con cultivos positivos no produzcan episodios de septicemia con mayor frecuencia, puede deberse en parte al uso habitual de antibióticos de amplio espectro en estos pacientes (el 76,5% de los pacientes estaban recibiendo antibióticos de amplio espectro 24 horas antes de la infusión de PH en el estudio de Stroncek y *col.*^[270] y el 100% de nuestros pacientes). Aunque en nuestra opinión, también podría explicarse por el hecho de que en el momento de la infusión la mayoría de los pacientes aún mantienen una cantidad de granulocitos adecuados para combatir algunos gérmenes con baja patogenicidad.

En referencia a la documentación microbiológica objetivada en los episodios febriles de los pacientes de nuestro estudio una posible explicación a la aparición de reactivaciones y enfermedades por CMV en el grupo de TPH con depleción de DMSO podría atribuirse al uso de dexametasona a dosis de 4 mg diarios durante todo el ingreso del TPH y a su documentación precoz debido a la instauración de un protocolo de monitorización del CMV mediante PCR de forma semanal a todos los TPH desde 2008, así como la disponibilidad de la técnica de laboratorio en nuestro centro. Por otro lado en el grupo de TPH sin depleción de DMSO la presencia de microorganismos gram negativos ha sido mayor que en el grupo a estudio, siendo una posible explicación la utilización de meropenem como antibiótico de amplio espectro desde el día -1 del TPH a todos los pacientes de dicho grupo.

CONCLUSIONES

La interpretación de los resultados obtenidos con nuestro protocolo de lavado del DMSO de los PHSP mediante un sistema automático y cerrado con la Sepax[®] S-100 en el TASPE nos permite concluir:

- 1- El procedimiento de lavado del DMSO de los PHSP previamente criopreservados, mediante un sistema automático y cerrado, no produce una pérdida significativa de células CD34+ y UFC-Meg.**
- 2- El procedimiento de lavado del DMSO con la Sepax[®] S-100 es seguro: no incrementa el riesgo de contaminación bacteriana, no afecta al tiempo de injerto de leucocitos, neutrófilos, y no aumenta los requerimientos transfusionales de los pacientes trasplantados.**
- 3- El procedimiento de lavado del DMSO con la Sepax[®] S-100 es eficaz: disminuye drásticamente el número de reacciones adversas durante la infusión de PHSP, secundarias a la toxicidad derivada del DMSO y de restos celulares.**

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Majado MJ, Garcia de Insausti C, Moraleda JM: Hematopoyesis. Hematíes: estructura y función; en Moraleda JM, (ed): Pregrado de Hematología. Luzán 5, S.A., 2011, pp 15-33.
- 2 Appelbaum FR, Forman SJ, Negrin RS, Blume KG: Thomas' Hematopoietic cell transplantation. ed 4ª, Oxford, Wiley-Blackwell, 2010.
- 3 Florensa L, Woessner S: Hematopoyesis. Morfología de los elementos formes de la sangre y órganos hematopoyéticos; en Sans-Sabrafen J, Besses C, Vives JL, (eds): Hematología Clínica. Madrid, Elsevier España, S.A., 2006, pp 1-32.
- 4 Simmons PJ, Zannettino A, Gronthos S, Leavesley D: Potential adhesion mechanisms for localisation of haemopoietic progenitors to bone marrow stroma. *Leuk Lymphoma* 1994;12:353-363.
- 5 Simmons PJ, Levesque JP, Zannettino AC: Adhesion molecules in haemopoiesis. *Baillieres Clin Haematol* 1997;10:485-505.
- 6 Verfaillie CH, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P: Anatomy and Physiology of hematopoiesis; en Hoffman R, (ed): Hematology. Basic Principles and Practice. Philadelphia, Churchill Livingstone, 2000, pp 139-154.
- 7 Hurley RW, McCarthy JB, Verfaillie CM: Direct adhesion to bone marrow stroma via fibronectin receptors inhibits hematopoietic progenitor proliferation. *J Clin Invest* 1995;96:511-519.
- 8 Levesque JP, Haylock DN, Simmons PJ: Cytokine regulation of proliferation and cell adhesion are correlated events in human CD34+ hemopoietic progenitors. *Blood* 1996;88:1168-1176.
- 9 Liekens S, Schols D, Hatse S: CXCL12-CXCR4 axis in angiogenesis, metastasis and stem cell mobilization. *Curr Pharm Des* 2010;16:3903-3920.
- 10 Perez-Calvo J: Factores que influyen sobre el injerto en el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica; Director: Villegas Martinez A. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina, Departamento de Medicina, 2003.
- 11 Korbling M, Flidner TM: History of Blood Stem Cell Transplants; en Gale RP, Juttner C, Henon P, (eds): Blood Stem Cell Transplants. Cambridge, Cambridge University Press, 1994, pp 9-19.
- 12 Lansdorp PM: Molecular aspects of stem cell renewal; en Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, (eds): Hematopoietic Cell Transplantation. Malden: Blackwell Science, 1999, pp 48-57.
- 13 Rodriguez L: Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados: control de calidad, estabilidad osmótica y lavado de DMSO.; Director: García López J; Rutlant Bañeras M; Querol Giner S. Universitat Autònoma Barcelona, Facultat de Medicina, Departament de Medicina, 2005.
- 14 Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS: CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996;87:1-13.

- 15 Siena S, Bregni M, Brando B, Belli N, Ravagnani F, Gandola L, Stern AC, Lansdorp PM, Bonadonna G, Gianni AM: Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood* 1991;77:400-409.
- 16 Verfaillie CM, Ploemacher R, Di PJ, Sutherland R, Serke S, Johnsen H, Noga S, Negrin R: Assays to determine hematopoietic stem cell content in blood or marrow grafts. *Cytotherapy* 1999;1:41-49.
- 17 Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H: Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996;273:242-245.
- 18 Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M: Human bone marrow. *Exp Hematol* 1998;26:353-360.
- 19 Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE: A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med* 1998;4:1038-1045.
- 20 Sato T, Laver JH, Ogawa M: Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1999;94:2548-2554.
- 21 Goodell MA: Introduction: Focus on hematology. CD34(+) or CD34(-): does it really matter? *Blood* 1999;94:2545-2547.
- 22 Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID: Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. *J Exp Med* 1989;169:1721-1731.
- 23 Sakabe H, Ohmizono Y, Tanimukai S, Kimura T, Mori KJ, Abe T, Sonoda Y: Functional differences between subpopulations of mobilized peripheral blood-derived CD34+ cells expressing different levels of HLA-DR, CD33, CD38 and c-kit antigens. *Stem Cells* 1997;15:73-81.
- 24 Verfaillie CM, Miller JS: CD34+/. *Blood* 1994;84:1442-1449.
- 25 To LB, Haylock DN, Dowse T, Simmons PJ, Trimboli S, Ashman LK, Juttner CA: A comparative study of the phenotype and proliferative capacity of peripheral blood (PB) CD34+ cells mobilized by four different protocols and those of steady-phase PB and bone marrow CD34+ cells. *Blood* 1994;84:2930-2939.
- 26 Mohle R, Pforsich M, Fruehauf S, Witt B, Kramer A, Haas R: Filgrastim post-chemotherapy mobilizes more CD34+ cells with a different antigenic profile compared with use during steady-state hematopoiesis. *Bone Marrow Transplant* 1994;14:827-832.
- 27 Dercksen MW, Rodenhuis S, Dirkson MK, Schaasberg WP, Baars JW, van der Wall E, Slaper-Cortenbach IC, Pinedo HM, von dem Borne AE, van der Schoot CE, .: Subsets of CD34+ cells and rapid hematopoietic recovery after peripheral-blood stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 1995;13:1922-1932.
- 28 Millar BC, Millar JL, Shepherd V, Blackwell P, Porter H, Cunningham D, Judson I, Treleaven J, Powles RL, Catovsky D: The importance of CD34+/. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:469-475.

- 29 Siena S, Bregni M, Brando B, Ravagnani F, Bonadonna G, Gianni AM: Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1989;74:1905-1914.
- 30 Tjonnfjord GE, Steen R, Evensen SA, Thorsby E, Egeland T: Characterization of CD34+ peripheral blood cells from healthy adults mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1994;84:2795-2801.
- 31 Bender JG, Williams SF, Myers S, Nottleman D, Lee WJ, Unverzagt KL, Walker D, To LB, Van Epps DE: Characterization of chemotherapy mobilized peripheral blood progenitor cells for use in autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1992;10:281-285.
- 32 Syrjala M, Ruutu T, Jansson SE: A flow cytometric assay of CD34-positive cell populations in the bone marrow. *Br J Haematol* 1994;88:679-684.
- 33 Serke S, Arseniev L, Watts M, Fritsch G, Ingles-Esteve J, Johnsen HE, Lynch D, Cancelas JA, Meyer O, Kadar JG, Huhn D, Matcham J: Imprecision of counting CFU-GM colonies and CD34-expressing cells. *Bone Marrow Transplant* 1997;20:57-61.
- 34 Johnsen HE: Toward a worldwide standard for CD34+ enumeration? *J Hematother* 1997;6:83-89.
- 35 Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I: The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother* 1996;5:213-226.
- 36 Gratama JW, Orfao A, Barnett D, Brando B, Huber A, Janossy G, Johnsen HE, Keeney M, Marti GE, Preijers F, Rothe G, Serke S, Sutherland DR, van der Schoot CE, Schmitz G, Papa S: Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *European Working Group on Clinical Cell Analysis. Cytometry* 1998;34:128-142.
- 37 Johnsen HE, Baech J, Nikolajsen K: Validation of the Nordic flow cytometry standard for CD34+ cell enumeration in blood and autografts: report from the third workshop. *Nordic Stem Cell Laboratory Group. J Hematother* 1999;8:15-28.
- 38 Wunder E: Short term colony assay for CFU-GM; in Wunder E, Henon P, (eds): *Peripheral blood stem cell autografts*. Berlín, Springer-Verlag, 1993, pp 128-131.
- 39 Lamana M, Albella B, Rodriguez F, Regidor C, Bueren JA: Conclusions of a national multicenter intercomparative study of in vitro cultures of human hematopoietic progenitors. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:373-380.
- 40 Ploemacher RE, van der Sluijs JP, Voerman JS, Brons NH: An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood* 1989;74:2755-2763.
- 41 Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM: Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* 1989;74:1563-1570.

- 42 McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD, Lieberman M, Weissman IL: The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 1988;241:1632-1639.
- 43 Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JC, Bhatia M, Lapidot T, Moritz T, Murdoch B, Xiao XL, Kato I, Williams DA, Dick JE: Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med* 1996;2:1329-1337.
- 44 Srour EF, Zanjani ED, Cornetta K, Traycoff CM, Flake AW, Hedrick M, Brandt JE, Leemhuis T, Hoffman R: Persistence of human multilineage, self-renewing lymphohematopoietic stem cells in chimeric sheep. *Blood* 1993;82:3333-3342.
- 45 Forkner C: Leukemia and allied disorders. New York, Mcmillan, 1938.
- 46 Osgood E: Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow: case report. *Ann Intern Med* 1939;13:357.
- 47 Thomas E, Storb R: The development of the scientific foundation of hematopoietic cell transplantation based on animal and human studies; en Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, (eds): Hematopoietic Cell Transplantation. Malden: Blackwell Science, 1999, pp 1-11.
- 48 Jacobson L, Simons E, Marks E, Eldrege J: Recovery from radiation injury. *Science* 1951;113:510-511.
- 49 Jacobson L, Simons E, Marks E, Robson M, Bethard W, Gaston E: The role of the spleen in radiation injury and recovery. *J Lab Clin Med* 1950;35:746-770.
- 50 Lorenz E, Congdon C, Uphoff D: Modification of acute irradiation injury in mice and guinea-pigs by bone marrow injections. *Radiology* 1952;58:863-877.
- 51 Lorenz E, Congdon CC: Modification of lethal irradiation injury in mice by injection of homologous or heterologous bone. *J Natl Cancer Inst* 1954;14:955-965.
- 52 Ferrebee J, Lochte H, Jr., Jaretzki A, III, Sahler O, Thomas E: Successful marrow homograft in the dog after radiation. *Surgery* 1958;43:516-520.
- 53 Thomas E, Lochte H, Jr., Lu W, Ferrebee J: Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957;257:491-496.
- 54 Mathe G, Jammet H, Pendic B, Schwarzenberg L, Duplan JF, Maupin B, Latarjet R, Larrieu MJ, Kalic D, Djukic Z: [Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation]. *Rev Fr Etud Clin Biol* 1959;4:226-238.
- 55 Miescher P, Fauconnet M: [Antigenic components of the polynuclear leukocyte and their clinical importance]. *Schweiz Med Wochenschr* 1954;84:1036-1038.
- 56 Dausset J: [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol* 1958;20:156-166.
- 57 Dausset J, Rapaport FT, Legrand L, Colombani J, Barge A, Feingold N: [Studies on transplantation antigens (HL-A) by means of skin grafts from 90 children onto their fathers]. *Nouv Rev Fr Hematol* 1969;9:215-229.

- 58 Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA: Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968;2:1366-1369.
- 59 Thomas ED, Buckner CD, Rudolph RH, Fefer A, Storb R, Neiman PE, Bryant JI, Chard RL, Clift RA, Epstein RB, Fialkow PJ, Funk DD, Giblett ER, Lerner KG, Reynolds FA, Slichter S: Allogeneic marrow grafting for hematologic malignancy using HL-A matched donor-recipient sibling pairs. *Blood* 1971;38:267-287.
- 60 Thomas ED: Bone marrow transplantation: past, present and future. *Rev Invest Clin* 1994;Suppl:5-6.
- 61 Thomas ED, Sr.: Stem cell transplantation: past, present and future. *Stem Cells* 1994;12:539-544.
- 62 Bach FH, Albertini RJ, Joo P, Anderson JL, Bortin MM: Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* 1968;2:1364-1366.
- 63 de Koning J, van Bekkum DW, Dicke KA, Dooren LJ, Radl J, van Rood JJ: Transplantation of bone-marrow cells and fetal thymus in an infant with lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1969;1:1223-1227.
- 64 Ferrebee J, Billen D, Urso I, Lu W, Thomas E, Congdon C: Preservation of radiation recovery factor in frozen marrow. *Blood* 1957;12:1096-1100.
- 65 Lovelock J, Bishop M: Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 1959;183:1394-1395.
- 66 Donnenberg AD, Koch EK, Griffin DL, Stanczak HM, Kiss JE, Carlos TM, Buchbarker DM, Yeager AM: Viability of cryopreserved BM progenitor cells stored for more than a decade. *Cytotherapy* 2002;4:157-163.
- 67 Kurnick N, Montano A, Gerdes J, Feder B: Preliminary observations on the treatment of postirradiation hematopoietic depression in man by the infusion of stored autogenous bone marrow. *Ann Intern Med* 1958;49:973-986.
- 68 McGovern J, Jr., Russell PS, Atkins L, Webster E: Treatment of terminal leukemic relapse by total-body irradiation and intravenous infusion of stored autologous bone marrow obtained during remission. *N Engl J Med* 1959;260:675-683.
- 69 Appelbaum FR, Herzig GP, Ziegler JL, Graw RG, Levine AS, Deisseroth AB: Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. *Blood* 1978;52:85-95.
- 70 Goodman JW, Hodgson GS: Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood* 1962;19:702-714.
- 71 Korbling M, Burke P, Braine H, Elfenbein G, Santos G, Kaizer H: Successful engraftment of blood derived normal hemopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 1981;9:684-690.
- 72 McCredie KB, Hersh EM, Freireich EJ: Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science* 1971;171:293-294.

- 73 Goldman JM, Catovsky D, Galton DA: Reversal of blast-cell crisis in C.G.I. by transfusion of stored autologous buffy-coat cells. *Lancet* 1978;1:437-438.
- 74 Goldman JM, Catovsky D, Goolden AW, Johnson SA, Galton DA: Buffy coat autografts for patients with chronic granulocytic leukaemia in transformation. *Blut* 1981;42:149-155.
- 75 Korbling M, Freireich EJ: Twenty-five years of peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2011;117:6411-6416.
- 76 Bell AJ, Figs A, Oscier DG, Hamblin TJ: Peripheral blood stem cell autografting. *Lancet* 1986;1:1027.
- 77 Castaigne S, Calvo F, Douay L, Thomas F, Benbunan M, Gerota J, Degos L: Successful haematopoietic reconstitution using autologous peripheral blood mononucleated cells in a patient with acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1986;63:209-211.
- 78 Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Weisenburger DD: Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells. *Exp Hematol* 1986;14:192-196.
- 79 Kessinger A: Utilization of peripheral blood stem cells in autotransplantation. *Hematol Oncol Clin North Am* 1993;7:535-545.
- 80 Korbling M, Dorken B, Ho AD, Pezzutto A, Hunstein W, Flidner TM: Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood* 1986;67:529-532.
- 81 Reiffers J, Bernard P, David B, Vezon G, Sarlat A, Marit G, Moulinier J, Broustet A: Successful autologous transplantation with peripheral blood hemopoietic cells in a patient with acute leukemia. *Exp Hematol* 1986;14:312-315.
- 82 Tilly H, Bastit D, Lucet JC, Esperou H, Monconduit M, Piguet H: Haemopoietic reconstitution after autologous peripheral blood stem cell transplantation in acute leukaemia. *Lancet* 1986;2:154-155.
- 83 Richman CM, Weiner RS, Yankee RA: Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood* 1976;47:1031-1039.
- 84 Sheridan WP, Begley CG, Juttner CA, Szer J, To LB, Maher D, McGrath KM, Morstyn G, Fox RM: Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilised by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Lancet* 1992;339:640-644.
- 85 To LB, Haylock DN, Kimber RJ, Juttner CA: High levels of circulating haemopoietic stem cells in very early remission from acute non-lymphoblastic leukaemia and their collection and cryopreservation. *Br J Haematol* 1984;58:399-410.
- 86 Martin M: High-dose chemotherapy for breast cancer: clinical advantages of autologous peripheral blood progenitor cells (PBPC) compared with autologous bone marrow transplantation (ABMT). *Ann Oncol* 1995;6 Suppl 4:33-37.

- 87 Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H, Hermans J: Blood and marrow transplantation activity in Europe 1996. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant* 1998;22:227-240.
- 88 Organización Nacional de Trasplantes: Memoria de actividad. ONT 2010; 2011.
- 89 Flowers ME, Parker PM, Johnston LJ, Matos AV, Storer B, Bensinger WI, Storb R, Appelbaum FR, Forman SJ, Blume KG, Martin PJ: Comparison of chronic graft-versus-host disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. *Blood* 2002;100:415-419.
- 90 Garcia-Rayó S, Pérez-Calvo J, Martín-Algarra S, Martínez-Monge R, Fernández-Hidalgo O, Subira L, Martínez-Aguillo M, Rebollo J, Azinovic I, Brugarolas A: Multiple cycles of dose-intensive chemotherapy with repeated stem cell support as induction treatment in metastatic breast cancer: a feasibility study. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:235-242.
- 91 Pérez-Calvo J, Martínez-Aguillo M, García-Rayó S, Cajal T, Santisteban M, Ordóñez JM, Inoges S, Subira ML, Martín-Algarra S, Brugarolas A: Factors determining the actual received dose intensity in a program of multicyclic dose-intensive alternating chemotherapy with sequential stem cell support. *Acta Haematol* 2001;105:137-142.
- 92 Pettengell R, Woll PJ, Thatcher N, Dexter TM, Testa NG: Multicyclic, dose-intensive chemotherapy supported by sequential reinfusion of hematopoietic progenitors in whole blood. *J Clin Oncol* 1995;13:148-156.
- 93 Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, Varadi G, Kirschbaum M, Ackerstein A, Samuel S, Amar A, Brautbar C, Ben-Tal O, Eldor A, Or R: Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 1998;91:756-763.
- 94 Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R: Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996;2:52-58.
- 95 Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D: Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998;4:328-332.
- 96 Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van RF, Mittermueller J, de WT, Holler E, Ansari H: Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 1995;86:2041-2050.
- 97 Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, .: Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321:1174-1178.
- 98 Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, Ortega J, Souillet G, Ferreira E, Laporte JP, Fernandez M, Chastang C: Outcome of cord-blood

transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med* 1997;337:373-381.

99 Hansen JA, Gooley TA, Martin PJ, Appelbaum F, Chauncey TR, Clift RA, Petersdorf EW, Radich J, Sanders JE, Storb RF, Sullivan KM, Anasetti C: Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1998;338:962-968.

100 Graf T: Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood* 2002;99:3089-3101.

101 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-49.

102 Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM: Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002;109:1291-1302.

103 Moraleda Jiménez JM: La terapia celular en enfermedades no hematológicas: ¿sueño o realidad? *Rev Mex Hematol* 2011;12:239-241.

104 Moraleda JM, Ruiz Marcos F, Blanquer M, de Arriba F: ¿Qué son las células madres? *Hematología molecular* 2004;3:2-4.

105 Appelbaum FR: Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* 2001;411:385-389.

106 Carreras E: Fundamento, tipos y principales indicaciones del TPH; en Carreras E, Rovira M, Martínez C, (eds): *Manual de Trasplante hematopoyético*. Antares, 2010, pp 3-8.

107 Copelan EA: Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2006;354:1813-1826.

108 Burnett AK, Goldstone AH, Stevens RM, Hann IM, Rees JK, Gray RG, Wheatley K: Randomised comparison of addition of autologous bone-marrow transplantation to intensive chemotherapy for acute myeloid leukaemia in first remission: results of MRC AML 10 trial. UK Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Lancet* 1998;351:700-708.

109 Cassileth PA, Harrington DP, Appelbaum FR, Lazarus HM, Rowe JM, Paietta E, Willman C, Hurd DD, Bennett JM, Blume KG, Head DR, Wiernik PH: Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. *N Engl J Med* 1998;339:1649-1656.

110 Harousseau JL, Cahn JY, Pignon B, Witz F, Milpied N, Delain M, Lioure B, Lamy T, Desablens B, Guilhot F, Caillot D, Abgrall JF, Francois S, Briere J, Guyotat D, Casassus P, Audhuy B, Tellier Z, Hurloup P, Herve P: Comparison of autologous bone marrow transplantation and intensive chemotherapy as postremission therapy in adult acute myeloid leukemia. The Groupe Ouest Est Leucemies Aigues Myeloblastiques (GOELAM). *Blood* 1997;90:2978-2986.

- 111 Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R, de WT, Labar B, Resegotti L, Leoni F, Damasio E, Visani G, Papa G, .: Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups. *N Engl J Med* 1995;332:217-223.
- 112 Gökbuget N, Hoelzer D: HSCT for acute lymphoblastic leukaemia in adults; en Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T, (eds): Hematopoietic Stem Cell Transplantation. ESH-EBMT Handbook, 2008, pp 372-379.
- 113 Haioun C, Lepage E, Gisselbrecht C, Salles G, Coiffier B, Brice P, Bosly A, Morel P, Nouvel C, Tilly H, Lederlin P, Sebban C, Briere J, Gaulard P, Reyes F: Survival benefit of high-dose therapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma: final analysis of the prospective LNH87-2 protocol--a groupe d'Etude des lymphomes de l'Adulte study. *J Clin Oncol* 2000;18:3025-3030.
- 114 Johnston A, Coiffier B: HSCT for high-grade non-Hodgkin's lymphoma in adults; en Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T, (eds): Hematopoietic Stem Cell Transplantation. ESH-EBMT Handbook, 2008, pp 434-441.
- 115 Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, Somers R, Van Der Lelie H, Bron D, Sonneveld P, Gisselbrecht C, Cahn JY, Harousseau JL: Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1995;333:1540-1545.
- 116 Gribben JG: HSCT for low-grade non-Hodgkin's lymphoma in adults; en Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T, (eds): Hematopoietic Stem Cell Transplantation. ESH-EBMT Handbook, 2008, pp 442-453.
- 117 Sureda A: HSCT for Hodgkin's lymphoma in adults; en Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T, (eds): Hematopoietic Stem Cell Transplantation. ESH-EBMT Handbook, 2008, pp 454-463.
- 118 Femand JP, Ravaud P, Chevret S, Divine M, Leblond V, Belanger C, Macro M, Pertuiset E, Dreyfus F, Mariette X, Boccacio C, Brouet JC: High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma: up-front or rescue treatment? Results of a multicenter sequential randomized clinical trial. *Blood* 1998;92:3131-3136.
- 119 Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, Casassus P, Maisonneuve H, Facon T, Ifrah N, Payen C, Bataille R: A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med* 1996;335:91-97.
- 120 Saccardi R, Farge D: HSCT for autoimmune diseases in adults; en Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T, (eds): Hematopoietic Stem Cell Transplantation. ESH-EBMT Handbook, 2008, pp 472-479.
- 121 Goldman JM, Schmitz N, Niethammer D, Gratwohl A: Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe in 1998. Accreditation Sub-Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1998;21:1-7.

- 122 Gratwohl A, Hermans J: Indications and donor source of hematopoietic stem cell transplants in Europe 1993: report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Clin Transplant 1995;9:355-363.
- 123 Gratwohl A, Hermans J, Baldomero H: Hematopoietic precursor cell transplants in Europe: activity in 1994. Report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Bone Marrow Transplant 1996;17:137-148.
- 124 Dupont B: Immunology of hematopoietic stem cell transplantation: a brief review of its history. Immunol Rev 1997;157:5-12.
- 125 Moraleda JM, Inieta F, Sánchez-Salinas A: Trasplante de progenitores hematopoyéticos; en Moraleda JM, (ed): Pregrado de Hematología.. Luzán 5, S.A., 2011, pp 481-516.
- 126 Carreras E, Rozman C: Trasplante de progenitores hematopoyéticos; en Sans-Sabrafen J, Bess C, Vives JL, (eds): Hematología Clínica. Madrid, Elsevier España, S.A., 2006, pp 789-807.
- 127 Brunet S: Tratamiento de Acondicionamiento; en Carreras E, Rovira M, Martinez C, (eds): Manual de Trasplante Hematopoyético. Barcelona, Editorial Antares, 2010, pp 227-240.
- 128 Nieto Y: Pharmacodynamics of high-dose chemotherapy. Curr Drug Metab 2001;2:53-66.
- 129 Martin M, Casado C, Llorente L, López Martin JA, Rodríguez Lescure A, Nieto Y, Ayala F, Pérez-Calvo C, Villegas A, Díaz-Rubio E: Quimioterapia intensiva con cuatro fármacos y trasplante autogénico de células progenitoras de sangre periférica en el cáncer diseminado de mama. Medicina Clínica 1997;109:775-781.
- 130 Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, Saral R, Beschoner WE, Bias WB, Braine HG, Burns WH, Effenbein GJ, Kaizer H, .: Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. N Engl J Med 1983;309:1347-1353.
- 131 Philip T, Armitage JO, Spitzer G, Chauvin F, Jagannath S, Cahn JY, Colombat P, Goldstone AH, Gorin NC, Flesh M, .: High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation after failure of conventional chemotherapy in adults with intermediate-grade or high-grade non-Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med 1987;316:1493-1498.
- 132 Jagannath S, Dicke KA, Armitage JO, Cabanillas FF, Horwitz LJ, Vellekoop L, Zander AR, Spitzer G: High-dose cyclophosphamide, carmustine, and etoposide and autologous bone marrow transplantation for relapsed Hodgkin's disease. Ann Intern Med 1986;104:163-168.
- 133 Gore ME, Selby PJ, Viner C, Clark PI, Meldrum M, Millar B, Bell J, Maitland JA, Milan S, Judson IR: Intensive treatment of multiple myeloma and criteria for complete remission. Lancet 1989;2:879-882.
- 134 Barlogie B, Hall R, Zander A, Dicke K, Alexanian R: High-dose melphalan with autologous bone marrow transplantation for multiple myeloma. Blood 1986;67:1298-1301.
- 135 Sauer-Heilborn A, Kadidlo D, McCullough J: Patient care during infusion of hematopoietic progenitor cells. Transfusion 2004;44:907-916.

- 136 Syme R, Bewick M, Stewart D, Porter K, Chadderton T, Gluck S: The role of depletion of dimethyl sulfoxide before autografting: on hematologic recovery, side effects, and toxicity. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004;10:135-141.
- 137 Calmels B, Lemarie C, Esterni B, Malugani C, Charbonnier A, Coso D, de Colella JM, Deconinck E, Caillot D, Viret F, Ladaïque P, Lapierre V, Chabannon C: Occurrence and severity of adverse events after autologous hematopoietic progenitor cell infusion are related to the amount of granulocytes in the apheresis product. *Transfusion* 2007;47:1268-1275.
- 138 Cordoba R, Arrieta R, Kerguelen A, Hernandez-Navarro F: The occurrence of adverse events during the infusion of autologous peripheral blood stem cells is related to the number of granulocytes in the leukapheresis product. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:1063-1067.
- 139 Martin-Henao GA, Resano PM, Villegas JM, Manero PP, Sanchez JM, Bosch MP, Codins AE, Bruguera MS, Infante LR, Oyarzabal AP, Soldevila RN, Caiz DC, Bosch LM, Barbeta EC, Ronda JR: Adverse reactions during transfusion of thawed haematopoietic progenitor cells from apheresis are closely related to the number of granulocyte cells in the leukapheresis product. *Vox Sang* 2010;99:267-273.
- 140 D'Hondt L, Wu J, Andre M, Lerberghe C, Guillaume T, Feyens AM, Humblet Y, Dromelet A, Chatelain B, Longueville J, Stewart F, D'Hondt V, Symann M: Clearance kinetics of CD34+ cells from peripheral blood: an independent predictor of hematologic recovery after high-dose chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999;24:483-489.
- 141 Prosper F, Stroncek D, McCarthy JB, Verfaillie CM: Mobilization and homing of peripheral blood progenitors is related to reversible downregulation of alpha4 beta1 integrin expression and function. *J Clin Invest* 1998;101:2456-2467.
- 142 Peters WP, Shpall EJ, Jones RB, Olsen GA, Bast RC, Gockerman JP, Moore JO: High-dose combination alkylating agents with bone marrow support as initial treatment for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1988;6:1368-1376.
- 143 Antman K, Ayash L, Elias A, Wheeler C, Hunt M, Eder JP, Teicher BA, Critchlow J, Bibbo J, Schnipper LE, .: A phase II study of high-dose cyclophosphamide, thiotepa, and carboplatin with autologous marrow support in women with measurable advanced breast cancer responding to standard-dose therapy. *J Clin Oncol* 1992;10:102-110.
- 144 Ketterer N, Sonet A, Dumontet C, Moullet I, Thieblemont C, Espinouse D, Bouafia F, Coiffier B, Salles G: Toxicities after peripheral blood progenitor cell transplantation for lymphoid malignancies: analysis of 300 cases in a single institution. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:1309-1315.
- 145 Roberts MM, To LB, Gillis D, Mundy J, Rawling C, Ng K, Juttner CA: Immune reconstitution following peripheral blood stem cell transplantation, autologous bone marrow transplantation and allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1993;12:469-475.
- 146 Chakraborty N, Bilgrami S, Maness L, Guo C, Perez-Diez A, Mukherji B, Tutschka P: Myeloablative chemotherapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation for

metastatic breast cancer: immunologic consequences affecting clinical outcome. *Bone Marrow Transplant* 1999;24:837-843.

147 Ozer H, Armitage JO, Bennett CL, Crawford J, Demetri GD, Pizzo PA, Schiffer CA, Smith TJ, Somlo G, Wade JC, Wade JL, III, Winn RJ, Wozniak AJ, Somerfield MR: 2000 update of recommendations for the use of hematopoietic colony-stimulating factors: evidence-based, clinical practice guidelines. American Society of Clinical Oncology Growth Factors Expert Panel. *J Clin Oncol* 2000;18:3558-3585.

148 Bolwell BJ, Pohlman B, Andresen S, Kalaycio M, Goormastic M, Wise K, Wakeling A, Dannley R, Overmoyer B: Delayed G-CSF after autologous progenitor cell transplantation: a prospective randomized trial. *Bone Marrow Transplant* 1998;21:369-373.

149 Rapoport AP, Miller Watelet LF, Linder T, Eberly S, Raubertas RF, Lipp J, Duerst R, Abboud CN, Constine L, Andrews J, Etter MA, Spear L, Powley E, Packman CH, Rowe JM, Schwertschlag U, Bedrosian C, Liesveld JL: Analysis of factors that correlate with mucositis in recipients of autologous and allogeneic stem-cell transplants. *J Clin Oncol* 1999;17:2446-2453.

150 Snyder E: Hematopoietic Progenitor Stem Cells: A Primer for Medical Professionals. American Association of Blood Banks, 2000.

151 Eidenschink L, DiZerega G, Rodgers K, Bartlett M, Wells DA, Loken MR: Basal levels of CD34 positive cells in peripheral blood differ between individuals and are stable for 18 months. *Cytometry B Clin Cytom* 2012;82:18-25.

152 Brown RA, Adkins D, Goodnough LT, Haug JS, Todd G, Wehde M, Hendricks D, Ehlenbeck C, Laub L, DiPersio J: Factors that influence the collection and engraftment of allogeneic peripheral-blood stem cells in patients with hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 1997;15:3067-3074.

153 Kobbe G, Sohngen D, Bauser U, Schneider P, Germing U, Thiele KP, Rieth C, Hunerliturkoglu A, Fischer J, Frick M, Wernet P, Aul C, Heyll A: Factors influencing G-CSF-mediated mobilization of hematopoietic progenitor cells during steady-state hematopoiesis in patients with malignant lymphoma and multiple myeloma. *Ann Hematol* 1999;78:456-462.

154 Marit G, Thiessard F, Faberes C, Cony-Makhoul P, Boiron JM, Bernard P, Pigneux A, Puntous M, Agape P, Vezon G, Broustet A, Girault D, Salmi LR, Reiffers J: Factors affecting both peripheral blood progenitor cell mobilization and hematopoietic recovery following autologous blood progenitor cell transplantation in multiple myeloma patients: a monocentric study. *Leukemia* 1998;12:1447-1456.

155 Ng-Cashin J, Shea T: Mobilization of Autologous PBHCs for Support of High-Dose Cancer Therapy; en Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR, (eds): Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation. Blackwell Publishing, 2004, pp 576-587.

156 Scheid C, Draube A, Reiser M, Schulz A, Chemnitz J, Nelles S, Fuchs M, Winter S, Wickramanayake PD, Diehl V, Sohngen D: Using at least 5×10^6 /kg CD34+ cells for autologous stem cell transplantation significantly reduces febrile complications and use of antibiotics after transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:1177-1181.

- 157 Moscardo F, Sanz GF, Sanz MA: Unrelated-donor cord blood transplantation for adult hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* 2004;45:11-18.
- 158 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;8:257-260.
- 159 Prosper F, Sola C, Hornedo J, Arbona C, Menendez P, Orfao A, Lluch A, Cortes-Funes H, Lopez JJ, Garcia-Conde J: Mobilization of peripheral blood progenitor cells with a combination of cyclophosphamide, r-metHuSCF and filgrastim in patients with breast cancer previously treated with chemotherapy. *Leukemia* 2003;17:437-441.
- 160 To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA: The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 1997;89:2233-2258.
- 161 Del Cañizo MC, Vallejo C, Lopez N: Los cultivos celulares en el estudio de las hemopatías malignas. *Sangre* 1996;41:297-303.
- 162 To LB, Haylock DN, Dyson P, Simmons P, Juttner C: Chemotherapy-Based approaches to mobilization of progenitor cells; en Morstyn G, Sheridan WP, (eds): *Cell therapy. Stem cell transplantation, gene therapy and cellular immunotherapy*. Cambridge, Cambridge University Press, 1996, pp 130-145.
- 163 Schwartzberg LS, Birch R, Hazelton B, Tauer KW, Lee P, Jr., Altemose R, George C, Blanco R, Wittlin F, Cohen J: Peripheral blood stem cell mobilization by chemotherapy with and without recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *J Hematother* 1992;1:317-327.
- 164 Fukuda M, Kojima S, Matsumoto K, Matsuyama T: Autotransplantation of peripheral blood stem cells mobilized by chemotherapy and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in childhood neuroblastoma and non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 1992;80:327-331.
- 165 Brugger W, Bross K, Frisch J, Dern P, Weber B, Mertelsmann R, Kanz L: Mobilization of peripheral blood progenitor cells by sequential administration of interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor following polychemotherapy with etoposide, ifosfamide, and cisplatin. *Blood* 1992;79:1193-1200.
- 166 Duhren U, Villeval JL, Boyd J, Kannourakis G, Morstyn G, Metcalf D: Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 1988;72:2074-2081.
- 167 Prosper F, Stroncek D, Verfaillie CM: Phenotypic and functional characterization of long-term culture-initiating cells present in peripheral blood progenitor collections of normal donors treated with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1996;88:2033-2042.
- 168 Desikan KR, Barlogie B, Jagannath S, Vesole DH, Siegel D, Fassas A, Munshi N, Singhal S, Mehta J, Tindle S, Nelson J, Bracy D, Mattox S, Tricot G: Comparable engraftment kinetics following peripheral-blood stem-cell infusion mobilized with granulocyte colony-stimulating factor with or without cyclophosphamide in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 1998;16:1547-1553.

- 169 Woessner S: Hematopoyesis: mielopoyesis y linfopoyesis; en Woessner S, Florensa L (eds): La citología óptica en el diagnóstico hematológico. Acción Médica S.A. y Fundación española de Hematología y Hemoterapia, 2006, pp 1-81.
- 170 Perez-Calvo J, Fernandez-Hidalgo O, Subira ML, Martin-Algarra S, Salgado E, Brugarolas A: Mobilization of hematopoietic progenitor cells with a combination of docetaxel, adriamycin, 5-fluorouracil and filgrastim in breast cancer patients. *Haematologica* 2001;86:100-101.
- 171 Singer SL, Nicolson GL: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972;175:720-731.
- 172 Alberts BJ, Julian L, Martin R, Keith W: *Molecular Biology of the Cell*. ed 4th, New York and London, Garland Publishing, 2002.
- 173 Lotan RN: *Advanced Cell Biology*. New York, Van Nostrand, 1981.
- 174 Darnell JL, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D: *Molecular Cell Biology*. ed 4th, New York, W H Freeman & Co, 1999.
- 175 Guyton A: Transporte de iones y de moléculas a través de la membrana celular; en Guyton A, (ed): *Tratado de Fisiología Médica*. Madrid, McGraw-Hill - Interamericana, 1995, pp 40-53.
- 176 Hays LM, Crowe JH, Wolters W, Rudenko S: Factors affecting leakage of trapped solutes from phospholipid vesicles during thermotropic phase transitions. *Cryobiology* 2001;42:88-102.
- 177 Clerc SG, Thompson TE: Permeability of dimyristoyl phosphatidylcholine/dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer membranes with coexisting gel and liquid-crystalline phases. *Biophys J* 1995;68:2333-2341.
- 178 Steponkus P: *Effects of low temperatures on biological membranes*. New York, Academia Press, 1993.
- 179 Mendoza JA, Dulin P, Warren T: The lower hydrolysis of ATP by the stress protein GroEL is a major factor responsible for the diminished chaperonin activity at low temperature. *Cryobiology* 2000;41:319-323.
- 180 Philibert J: Adolf Fick and diffusion equations. *Defect and Diffusion forum* 2006;249:1-6.
- 181 Fleming KK, Hubel A: Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells: Emerging Science, Technology and Issues. *Transfus Med Hemother* 2007;34:268-275.
- 182 Steponkus P: *Advances in low temperature biology*. Jai Press, 1993.
- 183 Boiso I: *Criobiología*. Revista iberoamericana de fertilidad 2001;18.
- 184 Wolstenholme G, O'Connor M: *The Frozen Cell*. London, Ciba Foundation, 1970.
- 185 Mazur P: The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 1977;14:251-272.

- 186 Lamana Luzuriaga ML: Trasplante autólogo de médula ósea: efecto sobre el injerto de la manipulación de las células hematopoyéticas y de las variables clínicas; Director: Fernández-Rañada JM, Díaz Mediavilla J. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina, Departamento de Medicina, 1996.
- 187 McGee HA, Martin WJ: Cryochemistry. *Cryogenics* 1962;2:1-11.
- 188 Mazur P: Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963;47:347-369.
- 189 Nei T: Structure and function of frozen cells: freezing patterns and post-thaw survival. *J Microsc* 1978;112:197-204.
- 190 Farrant J, Woolgar A: Possible relationship between the physical properties of solutions and cell damage during freezing; en Wolstenholme G, O'Connor M, Churchill A, (eds): *The frozen cell*. London, 1970, pp 97-114.
- 191 Meryman HT: Cryoprotective agents. *Cryobiology* 1971;8:173-183.
- 192 Mazur P: Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984;247:C125-C142.
- 193 Lovelock J: The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 1953;10:414-426.
- 194 Meryman HT: Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology* 1971;8:489-500.
- 195 Karow AM, Jr., Webb WR: Tissue freezing. A theory for injury and survival. *Cryobiology* 1965;2:99-108.
- 196 Meryman HT: Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes. *Nature* 1968;218:333-336.
- 197 Woods EJ, Liu J, Derrow CW, Smith FO, Williams DA, Critser JK: Osmometric and permeability characteristics of human placental/umbilical cord blood CD34+ cells and their application to cryopreservation. *J Hematother Stem Cell Res* 2000;9:161-173.
- 198 Harris DT: Experience in autologous and allogeneic cord blood banking. *J Hematother* 1996;5:123-128.
- 199 Thomas ED: A history of haemopoietic cell transplantation. *Br J Haematol* 1999;105:330-339.
- 200 Keung YK, Cobos E, Morgan D, Park M, Dixon S, Wu K, Park CH: High cellular concentration of peripheral blood progenitor cells during cryopreservation adversely affects CFU-GM but not hematopoietic recovery. *J Hematother* 1996;5:73-77.
- 201 Rowley SD, Bensinger WI, Gooley TA, Buckner CD: Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation. *Blood* 1994;83:2731-2736.

- 202 Cabezudo E, Dalmases C, Ruz M, Sanchez JA, Torrico C, Sola C, Querol S, Garcia J: Leukapheresis components may be cryopreserved at high cell concentrations without additional loss of HPC function. *Transfusion* 2000;40:1223-1227.
- 203 Garcia JV: Criopreservadores concepto y manejo. *Biol Clin Hematol* 1984;6:219.
- 204 Elliot CJ, Samson DM, Kanfer EJ: Quality assurance in the irradiation of blood products. *Bone Marrow Transplant* 1994;14:494.
- 205 Willhite CC, Katz PI: Toxicology updates. Dimethyl sulfoxide. *J Appl Toxicol* 1984;4:155-160.
- 206 DiStefano V, Borgstedt HH: Reduction of dimethylsulfoxide to dimethylsulfide in the cat. *Science* 1964;144:1137-1138.
- 207 Galmes A, Besalduch J, Bargay J, Matamoros N, Duran MA, Morey M, Alvarez F, Mascaro M: Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide at -80 degrees C without rate-controlled freezing. *Transfusion* 1996;36:794-797.
- 208 Stiff PJ, Murgo AJ, Zaroulis CG, DeRisi MF, Clarkson BD: Unfractionated human marrow cell cryopreservation using dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch. *Cryobiology* 1983;20:17-24.
- 209 Lamana M, Regidor C, Bornstein R, Clemente B, Castro M: Criopreservación médula ósea. *Sangre* 1990;35:451-458.
- 210 Re A, Vijayaraghavan K, Basade MM, He S, Gulati SC: Long-term cryopreservation: successful trilineage engraftment after autologous bone marrow transplantation with bone marrow cryopreserved for seven years. *J Hematother* 1998;7:185-188.
- 211 Hernandez-Navarro F, Ojeda E, Arrieta R, Rios-Rull P, Garcia-Bustos J, Quevedo E, Martin Hernandez MP, Jimenez-Yuste V, Rodriguez-Luaces M, Lopez RM, Garcia-Miguel P, Martinez A, Sastre A, Calero F, Gomez-Pastrana F, Martinez B: Hematopoietic cell transplantation using plasma and DMSO without HES, with non-programmed freezing by immersion in a methanol bath: results in 213 cases. *Bone Marrow Transplant* 1998;21:511-517.
- 212 AuBuchon JS: Marrow Transplantation: Practical and technical aspects of stem cell reconstitution. 1992.
- 213 Mazur P: Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* 1970;168:939-949.
- 214 Foundation for the Accreditation of Hematopoietic Cell Therapy: Standards for Hematopoietic Progenitor Cell Collection, Processing and Transplantation. ed 1st, Neb, Omaha, 1996.
- 215 Branch DR, Calderwood S, Cecutti MA, Herst R, Solh H: Hematopoietic progenitor cells are resistant to dimethyl sulfoxide toxicity. *Transfusion* 1994;34:887-890.
- 216 Douay L, Gorin NC, David R, Stachowiak J, Salmon C, Najman A, Duhamel G: Study of granulocyte-macrophage progenitor (CFUc) preservation after slow freezing of bone marrow in the gas phase of liquid nitrogen. *Exp Hematol* 1982;10:360-366.

- 217 Goldman JM, Th'ng KH, Park DS, Spiers AS, Lowenthal RM, Ruutu T: Collection, cryopreservation and subsequent viability of haemopoietic stem cells intended for treatment of chronic granulocytic leukaemia in blast-cell transformation. *Br J Haematol* 1978;40:185-195.
- 218 Rowley SD, Anderson GL: Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 1993;11:389-393.
- 219 Alessandrino P, Bernasconi P, Caldera D, Colombo A, Bonfichi M, Malcovati L, Klersy C, Martinelli G, Maiocchi M, Pagnucco G, Varettoni M, Perotti C, Bernasconi C: Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion: analysis of 126 cases. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:533-537.
- 220 Lopez-Jimenez J, Cervero C, Munoz A, Hernandez-Madrid A, Fernandez PJ, Garcia LJ, Moro C, Maldonado M, Perez OJ, Otheo E, .: Cardiovascular toxicities related to the infusion of cryopreserved grafts: results of a controlled study. *Bone Marrow Transplant* 1994;13:789-793.
- 221 Okamoto Y, Takaue Y, Saito S, Shimizu T, Suzue T, Abe T, Sato J, Hirao A, Watanabe T, Kawano Y, .: Toxicities associated with cryopreserved and thawed peripheral blood stem cell autografts in children with active cancer. *Transfusion* 1993;33:578-581.
- 222 Perseghin P, Balduzzi A, Bonanomi S, Dassi M, Buscemi F, Longoni D, Rovelli A, Uderzo C: Infusion-related side-effects in children undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:116-118.
- 223 Styler MJ, Topolsky DL, Crilley PA, Covalsky V, Bryan R, Bulova S, Brodsky I: Transient high grade heart block following autologous bone marrow infusion. *Bone Marrow Transplant* 1992;10:435-438.
- 224 Hertenstein B, Stefanic M, Schmeiser T, Scholz M, Goller V, Clausen M, Bunjes D, Wiesneth M, Novotny J, Kochs M: Cardiac toxicity of bone marrow transplantation: predictive value of cardiologic evaluation before transplant. *J Clin Oncol* 1994;12:998-1004.
- 225 Keung YK, Lau S, Elkayam U, Chen SC, Douer D: Cardiac arrhythmia after infusion of cryopreserved stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1994;14:363-367.
- 226 Dhodapkar M, Goldberg SL, Tefferi A, Gertz MA: Reversible encephalopathy after cryopreserved peripheral blood stem cell infusion. *Am J Hematol* 1994;45:187-188.
- 227 Bond GR, Curry SC, Dahl DW: Dimethylsulphoxide-induced encephalopathy. *Lancet* 1989;1:1134-1135.
- 228 Calmels B, Houze P, Hengesse JC, Ducrot T, Malenfant C, Chabannon C: Preclinical evaluation of an automated closed fluid management device: Cytomate, for washing out DMSO from hematopoietic stem cell grafts after thawing. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:823-828.
- 229 Kessinger A, Armitage JO, Smith DM, Landmark JD, Bierman PJ, Weisenburger DD: High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for patients with lymphoma. *Blood* 1989;74:1260-1265.
- 230 Abrahamsen JF, Bakken AM, Bruserud O: Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells with 5-percent rather than 10-percent DMSO results in less apoptosis and necrosis in CD34+ cells. *Transfusion* 2002;42:1573-1580.

- 231 Bakken AM, Bruserud O, Abrahamsen JF: No differences in colony formation of peripheral blood stem cells frozen with 5% or 10% dimethyl sulfoxide. *J Hematother Stem Cell Res* 2003;12:351-358.
- 232 Rowley SD, Feng Z, Chen L, Holmberg L, Heimfeld S, MacLeod B, Bensinger WI: A randomized phase III clinical trial of autologous blood stem cell transplantation comparing cryopreservation using dimethylsulfoxide vs dimethylsulfoxide with hydroxyethylstarch. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:1043-1051.
- 233 Martino M, Morabito F, Messina G, Irrera G, Pucci G, Iacopino P: Fractionated infusions of cryopreserved stem cells may prevent DMSO-induced major cardiac complications in graft recipients. *Haematologica* 1996;81:59-61.
- 234 Shpall EJ, LeMaistre CF, Holland K, Ball E, Jones RB, Saral R, Jacobs C, Heimfeld S, Berenson R, Champlin R: A prospective randomized trial of buffy coat versus CD34-selected autologous bone marrow support in high-risk breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *Blood* 1997;90:4313-4320.
- 235 Ayello J, Hesdorffer C, Reiss RF: A semiautomated technique for volume reduction of stem cell suspensions for autotransplantation. *J Hematother* 1995;4:545-549.
- 236 Del Mastro L, Venturini M, Viscoli C, Bergaglio M, Signorini A, Bighin C, Bertelli G, Semino C, Pietra G, Bertoglio S, Sertoli MR, Lambiase A, Rosso R, Melioli G: Intensified chemotherapy supported by DMSO-free peripheral blood progenitor cells in breast cancer patients. *Ann Oncol* 2001;12:505-508.
- 237 Beaujean F, Hartmann O, Kuentz M, Le FC, Divine M, Duedari N: A simple, efficient washing procedure for cryopreserved human hematopoietic stem cells prior to reinfusion. *Bone Marrow Transplant* 1991;8:291-294.
- 238 Rodriguez L, Velasco B, Garcia J, Martin-Henao GA: Evaluation of an automated cell processing device to reduce the dimethyl sulfoxide from hematopoietic grafts after thawing. *Transfusion* 2005;45:1391-1397.
- 239 Rodriguez L, Azqueta C, Azzalin S, Garcia J, Querol S: Washing of cord blood grafts after thawing: high cell recovery using an automated and closed system. *Vox Sang* 2004;87:165-172.
- 240 Sheridan WP: Transplantation of mobilized peripheral blood stem cells: role of filgrastim. *J Hematother* 1994;3:349-352.
- 241 Nadler SB, Hidalgo JH, Bloch T: Prediction of blood volume in normal human adults. *Surgery* 1962;51:224-232.
- 242 Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I: The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *J Hematother* 1996;5:213-226.
- 243 Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, Brown J, Drayson MT, Selby PJ: High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003;348:1875-1883.

- 244 Jagannath S, Vesole DH, Glenn L, Crowley J, Barlogie B: Low-risk intensive therapy for multiple myeloma with combined autologous bone marrow and blood stem cell support. *Blood* 1992;80:1666-1672.
- 245 Rebibou JM, Caillot D, Casasnovas RO, Tanter Y, Maillard N, Solary E, Rife G, Guy H: Peripheral blood stem cell transplantation in a multiple myeloma patient with end-stage renal failure. *Bone Marrow Transplant* 1997;20:63-65.
- 246 Kebriaei P, Madden T, Kazerooni R, Wang X, Thall PF, Ledesma C, Nieto Y, Shpall EJ, Hosing C, Qazilbash M, Popat U, Khouri I, Champlin RE, Jones RB, Andersson BS: Intravenous busulfan plus melphalan is a highly effective, well-tolerated preparative regimen for autologous stem cell transplantation in patients with advanced lymphoid malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:412-420.
- 247 Chopra R, McMillan AK, Linch DC, Yuklea S, Taghipour G, Pearce R, Patterson KG, Goldstone AH: The place of high-dose BEAM therapy and autologous bone marrow transplantation in poor-risk Hodgkin's disease. A single-center eight-year study of 155 patients. *Blood* 1993;81:1137-1145.
- 248 Gaspard MH, Maraninchi D, Stoppa AM, Gastaut JA, Michel G, Tubiana N, Blaise D, Novakovitch G, Rossi JF, Weiller PJ, .: Intensive chemotherapy with high doses of BCNU, etoposide, cytosine arabinoside, and melphalan (BEAM) followed by autologous bone marrow transplantation: toxicity and antitumor activity in 26 patients with poor-risk malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* 1988;22:256-262.
- 249 Shaw PJ, Bergin ME, Burgess MA, Dalla PL, Kellie SJ, Rowell G, Stevens MM, Webster BH, Bradstock KF: Childhood acute myeloid leukemia: outcome in a single center using chemotherapy and consolidation with busulfan/cyclophosphamide for bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1994;12:2138-2145.
- 250 Santos GW: Busulfan (Bu) and cyclophosphamide (Cy) for marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1989;4 Suppl 1:236-239.
- 251 Petersen FB, Deeg HJ, Buckner CD, Appelbaum FR, Storb R, Clift RA, Sanders JE, Bensinger WI, Witherspoon RP, Sullivan KM, .: Marrow transplantation following escalating doses of fractionated total body irradiation and cyclophosphamide--a phase I trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;23:1027-1032.
- 252 Burt RK, Loh Y, Cohen B, Stefoski D, Balabanov R, Katsamakis G, Oyama Y, Russell EJ, Stern J, Muraro P, Rose J, Testori A, Bucha J, Jovanovic B, Milanetti F, Storek J, Voltarelli JC, Burns WH: Autologous non-myeloablative haemopoietic stem cell transplantation in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase I/II study. *Lancet Neurol* 2009;8:244-253.
- 253 Gill P, Litzow M, Buckner J, Arndt C, Moynihan T, Christianson T, Ansell S, Galanis E: High-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation in adults with recurrent embryonal tumors of the central nervous system. *Cancer* 2008;112:1805-1811.
- 254 Diaz MA, Vicent MG, Madero L: High-dose busulfan/melphalan as conditioning for autologous PBPC transplantation in pediatric patients with solid tumors. *Bone Marrow Transplant* 1999;24:1157-1159.

- 255 Lee S, Kim S, Kim H, Baek EJ, Jin H, Kim J, Kim HO: Post-thaw viable CD34(+) cell count is a valuable predictor of haematopoietic stem cell engraftment in autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Vox Sang* 2008;94:146-152.
- 256 Akkok CA, Holte MR, Tangen JM, Ostenstad B, Bruserud O: Hematopoietic engraftment of dimethyl sulfoxide-depleted autologous peripheral blood progenitor cells. *Transfusion* 2009;49:354-361.
- 257 Giancola R, Oliosio P, Di RM, Capone A, Contento A, Pompetti F, Iacone A: Evaluation of an automated closed fluid management device for processing expanded cytokine-induced killer cells to use in immunotherapy programs for cancer. *Transfusion* 2008;48:629-639.
- 258 Laroche V, McKenna DH, Moroff G, Schierman T, Kadidlo D, McCullough J: Cell loss and recovery in umbilical cord blood processing: a comparison of postthaw and postwash samples. *Transfusion* 2005;45:1909-1916.
- 259 Perotti CG, Del FC, Viarengo G, Papa P, Rocchi L, Bergamaschi P, Bellotti L, Marchesi A, Salvaneschi L: A new automated cell washer device for thawed cord blood units. *Transfusion* 2004;44:900-906.
- 260 Smolyaninov A, Ivolgin D, Adylov S, Kotelevskaya E: Effectiveness of hematopoietic progenitor cell separation with the help of the Sepax S100 cell separator; *Cellular Therapy and Transplantation* 2009;2: No. 5:A77.
- 261 Zinno F, Landi F, Scerpa MC, Aureli V, Lanti A, Ceccarelli S, Caniglia M, Miele MJ, Daniele N, Landolfo A, Cometa AM, Locatelli F, Isacchi G: Processing of hematopoietic stem cells from peripheral blood before cryopreservation: use of a closed automated system. *Transfusion* 2011;51(12):2656-63.
- 262 Allan DS, Keeney M, Howson-Jan K, Popma J, Weir K, Bhatia M, Sutherland DR, Chin-Yee IH: Number of viable CD34(+) cells reinfused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002;29:967-972.
- 263 Feugier P, Bensoussan D, Girard F, Alla F, Schuhmacher A, Latger-Cannard V, Hulin C, Witz F, Witz B, Carret AS, Bordigoni P, Lederlin P, Janot C: Hematologic recovery after autologous PBPC transplantation: importance of the number of postthaw CD34+ cells. *Transfusion* 2003;43:878-884.
- 264 Reich-Slotky R, Colovai AI, Semidei-Pomales M, Patel N, Cairo M, Jhang J, Schwartz J: Determining post-thaw CD34+ cell dose of cryopreserved haematopoietic progenitor cells demonstrates high recovery and confirms their integrity. *Vox Sang* 2008;94:351-357.
- 265 Nagamura-Inoue T, Shioya M, Sugo M, Cui Y, Takahashi A, Tomita S, Zheng Y, Takada K, Kodo H, Asano S, Takahashi TA: Wash-out of DMSO does not improve the speed of engraftment of cord blood transplantation: follow-up of 46 adult patients with units shipped from a single cord blood bank. *Transfusion* 2003;43:1285-1295.
- 266 Menichella G, Pierelli L, Serafini R, Foddai ML, Vittori M, Paoloni A, De MM, Rossi PL, Mango G, Bizzi B: A comparison between two different procedures for bone marrow processing: a semiautomated procedure vs manual starch sedimentation. *Haematologica* 1991;76 Suppl 1:12-14.

- 267 Majado MJ, Garcia-Hernandez A, Morales A, Gonzalez C, Martinez-Sanchez V, Menasalvas A, Rosique P, Rubio A, Sanz-Imedio E: Influence of harvest bacterial contamination on autologous peripheral blood progenitor cells post-transplant. *Bone Marrow Transplant* 2007;39:121-125.
- 268 Humpe A, Riggert J, Vehmeyer K, Troff C, Hiddemann W, Kohler M, Wormann B: Comparison of CD34+ cell numbers and colony growth before and after cryopreservation of peripheral blood progenitor and stem cell harvests: influence of prior chemotherapy. *Transfusion* 1997;37:1050-1057.
- 269 Davis JM, Rowley SD, Braine HG, Piantadosi S, Santos GW: Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. *Blood* 1990;75:781-786.
- 270 Stroncek DF, Fautsch SK, Lasky LC, Hurd DD, Ramsay NK, McCullough J: Adverse reactions in patients transfused with cryopreserved marrow. *Transfusion* 1991;31:521-526.
- 271 Higman MA, Port JD, Beauchamp NJ, Jr., Chen AR: Reversible leukoencephalopathy associated with re-infusion of DMSO preserved stem cells. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:797-800.

APORTACIONES

I. Publicaciones.

- **Sánchez-Salinas A**, Cabañas-Perianes V, Blanquer M, Majado MJ, Insausti CL, Monserrat J, Sánchez-Ibañez MV, Menchón P, García-Hernández A, Gómez-Espuch J, Morales A, Moraleda JM: An automatic wash method for dimethylsulfoxide removal in autologous hematopoietic stem cell transplantation decreases the adverse effects related to infusion. *Transfusion*. 2012 Nov;52(11):2382-6.

II. Comunicaciones a congresos.

- V. Cabañas, M. Blanquer Blanquer, M.J. Majado, **A. Sánchez Salinas**, V. Sánchez Ibáñez, P. Menchón, J. Monserrat, J.M. Moraleda.

Título: Sepax peripheral blood hematopoietic progenitors wash protocol reduces infusion adverse events preserving CD34+ cells numbers.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XXXIII World Congress of the International Society of Hematology. Jerusalem, Israel. October 2010.