



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA**

Comparación de dos Soluciones de Lavado  
para el Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos  
sin Dimetil Sulfóxido.

**D<sup>a</sup>. Catalina Cava Almohalla**

2015





# UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA

Comparación de dos soluciones de lavado para el trasplante de progenitores hematopoyéticos sin dimetil sulfóxido.

Dña. Catalina Cava Almohalla

2015

Directores:

Dr. D. Miguel Blanquer Blanquer

Dr. D. José María Moraleda Jiménez

Dr. D. Gregorio Castellanos Escrig



*“Más valdría no pretender nunca buscar la verdad sobre ninguna materia que hacerlo sin método, ya que los estudios desordenados y las meditaciones confusas perturban las luces naturales y ciegan el espíritu”.*

Descartes R. Discurso del método. Biblioteca Clásica y Contemporánea. Losada.  
Buenos Aires. (1974)



*A mis padres y hermanos  
A mi marido y mis tres hijos  
En memoria de Paco*



## **AGRADECIMIENTOS**



A lo largo del tiempo dedicado a la realización de esta tesis, creo que la palabra que más veces he repetido ha sido gracias. Las cosas que más valor tienen no se pagan con dinero, como el valioso tiempo que mis compañeros han dedicado a este trabajo. En especial quiero agradecer a Miguel Blanquer y a Salvador de Maya su ayuda inestimable. Al doctor Moraleda, quien desde el tiempo de mi formación como residente, depositó en mí su confianza y estuvo siempre dispuesto a colaborar conmigo en un posible proyecto de investigación. A María Senena Corbalán cuyo rigor en el trabajo científico ha sido para mí un modelo a seguir. A todas aquellas personas que han colaborado de una manera o de otra en la elaboración de esta tesis, como Pilar Menchón, Pilar Martínez, Assumpta Ferrer, Ana Marín Bermejo y Carmen Algueró. Finalmente a todos mis compañeros hematólogos cuya colaboración ha sido para mí de un gran valor.



## ÍNDICE



<b>I. ANTECEDENTES</b>	1
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	7
1. MÉDULA ÓSEA	9
1.1. Células Madre o células troncales	9
1.2. Hematopoyesis	11
1.2.1. Células progenitoras hematopoyéticas	14
1.2.2. Mecanismos de regulación	16
1.2.3. Estroma medular	18
1.3. Caracterización de las células progenitoras	19
1.3.1. Contadores automáticos para los recuentos celulares	19
1.3.2. Recuento de células CD34 <sup>+</sup> por citometría de flujo	19
1.3.3. Cultivos de colonias granulomacrofágicas y eritroides	21
2. EL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS	23
2.1. Objetivos	23
2.2. Indicaciones	23
2.3. Histocompatibilidad	30
2.4. Tipos de trasplante	31
2.5. Movilización	32
2.6. Recolección celular o aféresis	34
2.7. Criopreservación celular	35
2.7.1. Introducción	35
2.7.2. Fundamentos de la criopreservación	36
2.7.3. Lesiones crioaducidas	41
2.7.3.1. Formación de hielo	42
2.7.3.2. Estrés Osmótico	43
2.7.4. Crioprotectores	44
2.7.4.1. DMSO	45
2.7.4.1.1. Respuesta volumétrica celular a la adición y extracción del crioprotector	50
2.7.5. Descongelación y retorno a las condiciones fisiológicas	51
2.7.6. Lavado celular tras la descongelación	52
2.8. Acondicionamiento	54

2.9. Tiempo de injerto	55
2.10. Reconstitución inmune	56
3.COMPUUESTOS COLOIDALES EN MEDICINA TRANSFUSIONAL Y EN TERAPIA CELULAR	57
<b>III. HIPÓTESIS Y OBJETIVO</b>	<b>63</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>67</b>
1. Pacientes	69
2. Metodología del Trasplante	70
2.1. Movilización	70
2.2. Recolección de los progenitores hematopoyéticos	71
2.3. Criopreservación celular	72
2.4. Acondicionamiento	73
2.5. Descongelación y lavado	76
2.6. Infusión de progenitores hematopoyéticos	77
2.7. Manejo clínico y medidas de soporte postrasplante	77
3. Aparatos y soluciones de lavado	78
3.1. Procesadores celulares	78
3.2. Contadores celular automáticos: Sysmex KX-21N y Cell-DYN Sappire	80
3.3. Citómetro de flujo BD FACS Canto II	83
3.4. Sistema automático de lavado de DMSO en progenitores hematopoyéticos descongelados: SEPAX®	85
3.5. Soluciones de lavado	87
4. Controles	88
4.1. Recuentos celulares	89
4.2. Cultivos de progenitores hematopoyéticos	89
4.3. Viabilidad celular	91
4.4. Cultivos bacteriológicos	91
4.5. Análisis y cuantificación de las células CD34 <sup>+</sup>	92
5. Variables medidas	94
5.1. Variables clínicas	94

5.2. Variables del producto celular	95
5.3. Variables del injerto hematopoyético	95
5.4. Variables de seguridad en el paciente	96
6. Construcción de variables para la comparación de diferentes momentos del procedimiento entre ambos subgrupos y análisis estadístico empleado	96
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>101</b>
1. Características de los pacientes en los dos subgrupos	103
2. Estudio del producto celular	109
2.1. Características de los productos celulares en los dos subgrupos, en el momento final de aféresis, inmediatamente tras la descongelación y tras el lavado	109
2.1.1. Recuentos celulares en la bolsa de aféresis	109
2.1.2. Recuentos celulares inmediatos a la descongelación de las bolsas	110
2.1.3. Recuentos celulares tras el lavado de las bolsas	111
2.2. Estudio de los efectos de la congelación/descongelación sobre los progenitores hematopoyéticos	112
2.2.1. Análisis por bolsa	113
2.2.2. Análisis por proceso	114
2.2.3. Análisis por trasplante	115
2.3. Estudio de los efectos del procedimiento del lavado celular sobre los progenitores hematopoyéticos descongelados	116
2.3.1. Análisis por bolsa	117
2.3.2. Análisis por proceso	118
2.3.3. Análisis por trasplante	119
2.4. Estudio comparativo entre las variables en el momento final de aféresis y tras el lavado	120
2.4.1. Análisis por bolsa	121
2.4.2. Análisis por proceso	122
2.4.3. Análisis por trasplante	123
2.5. Resumen de resultados del estudio del producto celular a lo largo del proceso	124
2.6. Estudio comparativo entre la tasa de contaminación bacteriana del producto de aféresis y el producto lavado	127

3. Estudio del injerto	130
3.1. Estudio de eficacia del procedimiento de lavado comparando las características del injerto en ambos subgrupos según la solución de lavado empleada	130
3.1.1. Tiempos de injerto leucocitario y plaquetar	130
3.1.2. Requerimientos transfusionales	132
4. Estudio de la seguridad en el paciente	133
4.1. Estudio de seguridad del procedimiento de lavado, según la solución de lavado empleada	133
4.1.1. Tasa de aislamientos microbiológicos en los pacientes	133
4.1.2. Días de fiebre y días de hospitalización	135
4.1.3. Reacciones adversas de la infusión	135
4.1.4. Cifras de creatinina basal (antes de la infusión) y en el momento del alta hospitalaria	136
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	137
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	169
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	173
<b>IX. ANEXO. APORTACIONES DE TRABAJOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS</b>	203

**TABLAS:**

<b>Tabla 1.</b> Recuperaciones de CNT y de células CD34 <sup>+</sup> y viabilidad celular tras descongelado y tras lavado con Sepax®	5
<b>Tabla 2.</b> Origen y características de las células madre	11
<b>Tabla 3.</b> Acción de los factores de crecimiento sobre los PH	17
<b>Tabla 4.</b> Indicaciones TPH pacientes pediátricos (edad < 18 años)	25

<b>Tabla 5.</b> Indicaciones TPH adultos (edad $\geq$ 18 años)	27
<b>Tabla 6.</b> Reacciones adversas (RA) tras trasplante de PH	49
<b>Tabla 7.</b> Regímenes de Acondicionamiento más utilizados	55
<b>Tabla 8.</b> Soluciones de lavado para la eliminación del DMSO	62
<b>Tabla 9.</b> Distribución de la muestra por pacientes, por procesos de aféresis y por lavados	69
<b>Tabla 10</b> Dosis de Busulfán iv según peso	75
<b>Tabla 11.</b> Controles realizados en la muestras de PH a lo largo del proceso	88
<b>Tabla 12.</b> Variables del producto celular analizado	95
<b>Tabla 13.</b> Características de los pacientes en ambos subgrupos	103
<b>Tabla 14.</b> Patologías en los 4 grupos diagnósticos principales	104
<b>Tabla 15.</b> Distribución por número de líneas de tratamiento en cada subgrupo	106
<b>Tabla 16.</b> Distribución por el número de bolsas infundidas por trasplante en cada subgrupo	106
<b>Tabla 17.</b> Distribución por acondicionamientos en ambos subgrupos	108
<b>Tabla 18.</b> Recuentos celulares en cada uno de los subgrupos al final de la aféresis	109
<b>Tabla 19.</b> Variables por kg de peso del paciente por trasplante al final de la aféresis	109
<b>Tabla 20.</b> Recuentos celulares en cada uno de los subgrupos tras la descongelación	110
<b>Tabla 21.</b> Variables por kg de peso del paciente por trasplante tras la descongelación	110
<b>Tabla 22.</b> Recuentos celulares en cada uno de los subgrupos tras el lavado	111
<b>Tabla 23.</b> Variables por kg de peso del paciente por trasplante tras el lavado	111
<b>Tabla 24.</b> Comparaciones entre aféresis y descongelados por bolsa	113
<b>Tabla 25.</b> Recuperación entre aféresis y descongelados por bolsa	113
<b>Tabla 26.</b> Comparaciones entre aféresis y descongelado por proceso	114
<b>Tabla 27</b> Recuperación entre aféresis y descongelados por proceso	114
<b>Tabla 28</b> Comparaciones entre aféresis y descongelado por trasplante	115
<b>Tabla 29.</b> Recuperación entre aféresis y descongelados por trasplante	115

<b>Tabla 30.</b> Comparaciones entre descongelados y lavado por bolsa	117
<b>Tabla 31.</b> Recuperación entre descongelado y lavado por bolsa	117
<b>Tabla 32.</b> Comparaciones entre descongelados y lavado por proceso	118
<b>Tabla 33.</b> Recuperación entre descongelado y lavado por proceso	118
<b>Tabla 34.</b> Comparaciones entre descongelados y lavado por trasplante	119
<b>Tabla 35.</b> Recuperación entre descongelado y lavado por trasplante	119
<b>Tabla 36.</b> Comparaciones entre aféresis y lavado por bolsa	121
<b>Tabla 37.</b> Recuperación entre aféresis y lavado por bolsa	121
<b>Tabla 38.</b> Comparaciones entre aféresis y lavado por proceso	122
<b>Tabla 39.</b> Recuperación entre aféresis y lavado por proceso	122
<b>Tabla 40.</b> Comparaciones entre aféresis y lavado por trasplante	123
<b>Tabla 41.</b> Recuperación entre aféresis y lavado por trasplante	123
<b>Tabla 42.</b> Comparaciones entre aféresis y lavado por bolsa	127
<b>Tabla 43.</b> Relación de gérmenes bacterianos aislados en los cultivos de las bolsas antes y después del lavado, en el grupo lavado con SSA	128
<b>Tabla 44.</b> Relación de gérmenes bacterianos aislados en los cultivos de las bolsas antes y después del lavado, en el grupo lavado con Voluven®	129
<b>Tabla 45.</b> Tiempos de injerto por tipos de lavado	130
<b>Tabla 46.</b> Transfusiones requeridas por tipo de lavado	132
<b>Tabla 47.</b> Aislamientos microbiológicos en pacientes por tipo de lavado	133
<b>Tabla 48.</b> Relación de gérmenes bacterianos aislados en los cultivos de las muestras tomadas a los pacientes trasplantados	134
<b>Tabla 49.</b> Días de fiebre y de hospitalización por subgrupos	135
<b>Tabla 50.</b> Comparación de las cifras de creatinina basales y al alta	136
<b>Tabla 51.</b> Resumen de publicaciones sobre lavados de progenitores hematopoyéticos	165

## IMÁGENES:

<b>Imagen 1.</b> Esquema del desarrollo embrionario	9
<b>Imagen 2.</b> Células troncales hematopoyéticas y células troncales mesenquimales	10
<b>Imagen 3.</b> Esquema general de la Hematopoyesis	12
<b>Imagen 4 .</b> Nicho osteoblástico y nicho vascular	13
<b>Imagen 5</b> Perfil antigénico durante la hematopoyesis	16
<b>Imagen 6.</b> Complejo mayor de Histocompatibilidad localizado en el brazo corto del cromosoma 6	30
<b>Imagen 7.</b> Esquema del frente de nucleación. Congelación en bolsa	39
<b>Imagen 8.</b> Representación esquemática de la respuesta celular a la congelación	40
<b>Imagen 9.</b> Curva de congelación para progenitores hematopoyéticos. Inducción de la nucleación durante la congelación de CPH	40
<b>Imagen 10.</b> Naturaleza de los daños crioinducidos según la velocidad de congelación	43
<b>Imagen 11.</b> Estructura molecular del dimetil sulfóxido	45
<b>Imagen 12.</b> Variaciones de volumen celular asociados a la adición de un 10% v/v DMSO a temperatura ambiente	50
<b>Imagen 13.</b> Variaciones de volumen celular asociados a la extracción de DMSO a temperatura ambiente	51
<b>Imagen 14.</b> Representación esquemática de la respuesta celular a la descongelación	51
<b>Imagen 15.</b> Respuesta celular a un cambio brusco de osmolaridad	52
<b>Imagen 16.</b> Recuentos aproximados de células inmunes	56
<b>Imagen 17.</b> Fases de infecciones oportunistas en receptores de trasplante alogénico de PH	57
<b>Imagen 18:</b> Esquema molecular del Hidroxietil almidón	58
<b>Imagen 19.</b> Estructura de un fragmento de Dextrano	59

<b>Imagen 20.</b> Fórmula volumen sanguíneo	71
<b>Imagen 21</b> Congelador biológico programable	73
<b>Imagen 22:</b> Tanque de nitrógeno líquido	73
<b>Imagen 23.</b> Descongelado en baño a 37°C	76
<b>Imagen 24.</b> Lavado de PH con Sepax®	76
<b>Imagen 25.</b> Momento de la infusión de PH lavados	77
<b>Imagen 26.</b> Esquema de las diferentes densidades de los elementos sanguíneos	78
<b>Imagen 27.</b> Procesadores celulares utilizados. De derecha a izquierda: Fenwall CS-3000 plus®, Cobe® Spectra y Optia® Spectra	80
<b>Imagen 28:</b> Principio de Coulter para el recuento celular	81
<b>Imagen 29.</b> Tecnología M.A.P.S.S. de Abbott	82
<b>Imagen 30.</b> Sysmex® KX-21N	82
<b>Imagen 31.</b> Contador Cell-Dyn Sapphire	82
<b>Imagen 32.</b> Citómetro de flujo BD FACSCanto II®	83
<b>Imagen 33.</b> Dispositivo Sepax®	85
<b>Imagen 34.</b> Equipo desechable del sistema Sepax®	86
<b>Imagen 35.</b> Esquema del protocolo de lavado Sepax®	87
<b>Imagen 36.</b> Imágenes de colonias clonogénicas de PH	90
<b>Imagen 37.</b> Representación esquemática de los recuentos celulares en un proceso de aféresis	97

## GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Distribución por sexo en ambos subgrupos	104
<b>Gráfico 2.</b> Distribución por edad en ambos subgrupos	105
<b>Gráfico 3.</b> Distribución por peso en ambos subgrupos	105
<b>Gráfico 4.</b> Distribución por número de líneas de tratamiento previas en ambos subgrupos	105
<b>Gráfico 5.</b> Distribución por número de lavados realizados por trasplante	106
<b>Gráfico 6.</b> Distribución de lavados por diagnósticos	107
<b>Gráfico 7.</b> Distribución de lavados por acondicionamientos	107
<b>Gráfico 8.</b> Pérdidas celulares analizadas para el total de la muestra	125
<b>Gráfico 9.</b> Pérdidas celulares en el subgrupo lavado con SSA	126
<b>Gráfico 10.</b> Pérdidas celulares en el subgrupo lavado con Voluven®	126
<b>Gráfico 11.</b> Cinética de injerto de leucocitos	131
<b>Gráfico 12:</b> Cinética de injerto de neutrófilos	131
<b>Gráfico 13.</b> Cinética de injerto de plaquetas	132

## **ABREVIATURAS**

**ACP:** Agente Crioprotector.

**CFU:** Unidad formadora de colonias.

**CNT:** Células nucleadas totales

**CPH:** Célula Progenitora Hematopoyética.

**CPH-A:** Célula Progenitora Hematopoyética obtenida mediante aféresis.

**DMSO:** Dimetil sulfóxido.

**EICH:** Enfermedad injerto contra huésped.

**EMA:** Agencia Europea del medicamento.

**FC:** Fase Crónica

**G-CSF:** Factor Estimulador de Colonias Granulocíticas.

**HES:** Almidón hidroxietilado.

**HLA:** Antígeno leucocitario humano.

**ITK:** Inhibidor de tirosin Kinasa

**MO:** médula ósea.

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PH:** Progenitores hematopoyéticos.

**RC:** Respuesta completa

**RP:** Respuesta parcial

**SCU:** Sangre de cordón umbilical.

**SD:** Desviación estándar

**SEM:** Error estándar de la media.

**SG:** Grado de densidad o densidad específica

**SP:** Sangre periférica.

**SSA:** Suero salino y Albúmina

**TMO:** Trasplante de médula ósea.

**TPH:** Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos

**TSCU:** Trasplante de sangre de cordón umbilical.

**TSP:** Trasplante de sangre periférica.



ANTECEDENTES

**ANTECEDENTES**

## ANTECEDENTES

## ANTECEDENTES

Actualmente la criopreservación de progenitores hematopoyéticos (PH) es un componente esencial del protocolo clínico de la mayoría de los trasplantes de progenitores hematopoyéticos (TPH). La criopreservación soluciona aspectos logísticos, como el intervalo de tiempo necesario entre la recolección de los progenitores hematopoyéticos del paciente y su posterior infusión tras la administración del régimen de acondicionamiento previsto en el trasplante autólogo. En el caso del trasplante de sangre de cordón umbilical, permite coordinar en el tiempo el momento de la recolección de los PH durante el alumbramiento y el momento en el que el paciente está preparado para el trasplante. Además, la criopreservación proporciona el tiempo necesario para una mejor caracterización y control de la calidad de los progenitores hematopoyéticos.

Desde los primeros estudios publicados sobre la congelación de PH por Barnes y Loutit en 1955 (1), se han realizado muchos experimentos para optimizar los protocolos de criopreservación con el propósito de mejorar la recuperación total y la capacidad funcional de los PH tras el proceso de congelación y descongelación. En el año 1962 Cavins et al. publicaron por primera vez la utilización del dimetil sulfóxido (DMSO) en la criopreservación de PH (2). Esta molécula se ha convertido en la más comúnmente utilizada, normalmente a una concentración final entre el 5 y el 10% (relación volumen 1:1). El DMSO es un agente coligativo capaz de ligar moléculas de agua, reduciendo así el agua disponible para la formación de cristales. Por otro lado, el descenso de la temperatura aumenta la viscosidad del DMSO, lo que dificulta la formación de una estructura cristalina y favorece la vitrificación.

En contrapartida, el DMSO tiene un efecto tóxico sobre la célula a temperatura ambiente. Su dilución libera calor y su incorporación rápida a la suspensión celular puede producir daño osmótico. Las suspensiones celulares descongeladas en presencia del crioprotector son hipertónicas, por lo que el retorno a condiciones isotónicas, como ocurre en el momento de la infusión, puede provocar una entrada masiva de agua al citoplasma (choque osmótico) en respuesta al cambio de osmolaridad.

En el año 1978 Goldman (3) publicó las primeras evidencias del choque osmótico sobre la reducción de capacidad clonogénica en MO descongelada. Este fenómeno, sin embargo, no tuvo una gran repercusión en los protocolos de criopreservación, probablemente, porque el número de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) en MO y

## ANTECEDENTES

en aféresis (CPH-A), estaba por encima del umbral mínimo definido para uso clínico. La situación cambia cuando se utiliza como fuente de PH la sangre de cordón umbilical (SCU), debido a su escasez en dicho producto.

En el año 1995 Rubinstein (4) investigando la relevancia del choque osmótico en productos hematopoyéticos descongelados, particularmente en la SCU, sugiere la necesidad de alcanzar la estabilidad osmótica previa a la infusión para reducir el efecto del cambio brusco de osmolaridad durante el retorno a condiciones isotónicas. Para conseguir dicha estabilidad osmótica estos investigadores proponen una dilución compuesta por solución salina isotónica con 2,5% de albúmina humana y 5% de dextrano 40 realizada inmediatamente tras la descongelación, con un volumen igual al de la unidad de progenitores hematopoyéticos de SCU descongelados. Con la eliminación del DMSO consiguieron reducir la pérdida de leucocitos viables un 39% respecto al grupo control con DMSO, sin pérdida de células progenitoras, determinadas por la formación de colonias clonogénicas (4).

Además del efecto tóxico sobre la célula, el DMSO genera otros efectos adversos durante la infusión que suelen ser dosis dependiente (5–7). Las complicaciones pueden ser leves como los mareos, o muy graves como fallos renales agudos y paradas cardíacas. Aunque las más frecuentes son las náuseas, el vómito, el dolor abdominal y los escalofríos (8,9). Una encuesta multinacional reciente que incluye datos de 97 centros trasplantadores de la EBMT, reveló que el DMSO produce una toxicidad distinta de náuseas y/o vómitos en aproximadamente uno de cada 50 trasplantes con una incidencia media de 2,2% de todas las unidades administradas. Los efectos secundarios cardiovasculares fueron el grupo de eventos adversos más frecuentemente observados, descritos en el 27% de los centros participantes. Se observaron eventos respiratorios en el 17%, toxicidad del SNC- incluyendo convulsiones- en el 5%, y efectos adversos renales en el 5% (10).

En consecuencia, la eliminación del DMSO del producto celular tras la descongelación y antes de la infusión parece lógica y necesaria para aumentar la seguridad del procedimiento, particularmente en los niños. Sin embargo, no está aún clara cual es la técnica óptima para evitar la pérdida de progenitores hematopoyéticos y minimizar los riesgos de infección durante el procedimiento de eliminación del DMSO. Recientemente se han propuesto procedimientos automáticos con sistemas cerrados. Estos sistemas fueron objeto de nuestro interés científico ya que, además de cumplir las premisas de seguridad, nos

## ANTECEDENTES

permitían el lavado en el laboratorio en lugar de en la cabecera del enfermo, evitando posibles imprevistos y ofreciendo una mayor flexibilidad temporal para iniciar la infusión.

Fruto de ese interés, nuestro grupo publicó sus primeros datos en el año 2012, comparando la infusión de PH lavados mediante un sistema automático para eliminar el DMSO (Sepax<sup>®</sup>, Biosafe) frente a la infusión de PH no lavados. En dicho trabajo demostramos que el lavado disminuía dramáticamente y con significación estadística los efectos adversos relacionados con la infusión. Como puede verse de forma resumida en la tabla 1, no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos en el número de células CD34<sup>+</sup> infundidas ni en su viabilidad. Como era de esperar en base a los resultados previos, la cinética del injerto también fue similar en ambos grupos, sin apreciarse ningún fallo de injerto en el grupo experimental en el que se realizó el lavado automático. Por otro lado fue la primera experiencia publicada del uso de suero salino suplementado con Albúmina al 5% (SSA) como solución de lavado (11).

Variables	PH descongelado	PH lavado	Recuperaciones (%)	<i>p</i>
CNT(x10 <sup>8</sup> /kg)	3,43 (±0,28)	2,44 (±0,34)	75,47 (±3)	<0,0001
CD34 <sup>+</sup> (x10 <sup>6</sup> /kg)	2,49 (±0,19)	2,15 (±0,31)	94,66 (±4)	NS
Viabilidad (%)	78,13 (±1,4)	76,05 (±1,44)		NS

\*Medias (±SEM)

**Tabla 1.** Recuperaciones de CNT y células CD34<sup>+</sup> y viabilidad celular tras descongelado y tras lavado con Sepax<sup>®</sup>. Tomado de Sánchez-Salinas et al. (11)

Posteriormente nuestro grupo se involucró en un grupo cooperativo internacional para investigar nuevas soluciones de lavado (Voluven, hidroxietil almidón) usando el mismo sistema automático Sepax<sup>®</sup>. Esta solución también ofreció excelentes resultados en términos de recuperación de células CD34<sup>+</sup> (recuperación del 101,2% ± 27,0 en contraste con los recuentos pre-congelación), viabilidad (recuperación del 87,2% ± 10,0), injerto y disminución de eventos adversos relacionados con la infusión (12).

## ANTECEDENTES

El objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral es comparar frente a frente la eficacia y seguridad de estas dos soluciones de lavado para la eliminación del DMSO y de los detritus celulares contenidos en los PH criopreservados, utilizando en ambos casos el sistema automático y cerrado de lavado Sepax®.

# INTRODUCCIÓN

## **INTRODUCCIÓN**

# INTRODUCCIÓN

# INTRODUCCIÓN

## 1.MÉDULA ÓSEA

La primera biopsia de médula ósea descrita fue realizada por Mosler en el año 1876 (13), aunque el aspirado medular no se convirtió en una práctica segura y útil en el estudio de las enfermedades hematológicas hasta los años treinta del pasado siglo. En los años sesenta se describió la existencia de una célula stem hematopoyética en los experimentos realizados por Till y McCulloch (14). Y en los años setenta, Friedenstein et al. identificaron la célula progenitora del estroma medular (15), conocida actualmente como célula stem mesénquimal (MSC, mesenchymal stem cell).

### 1.1.Células madre o células troncales

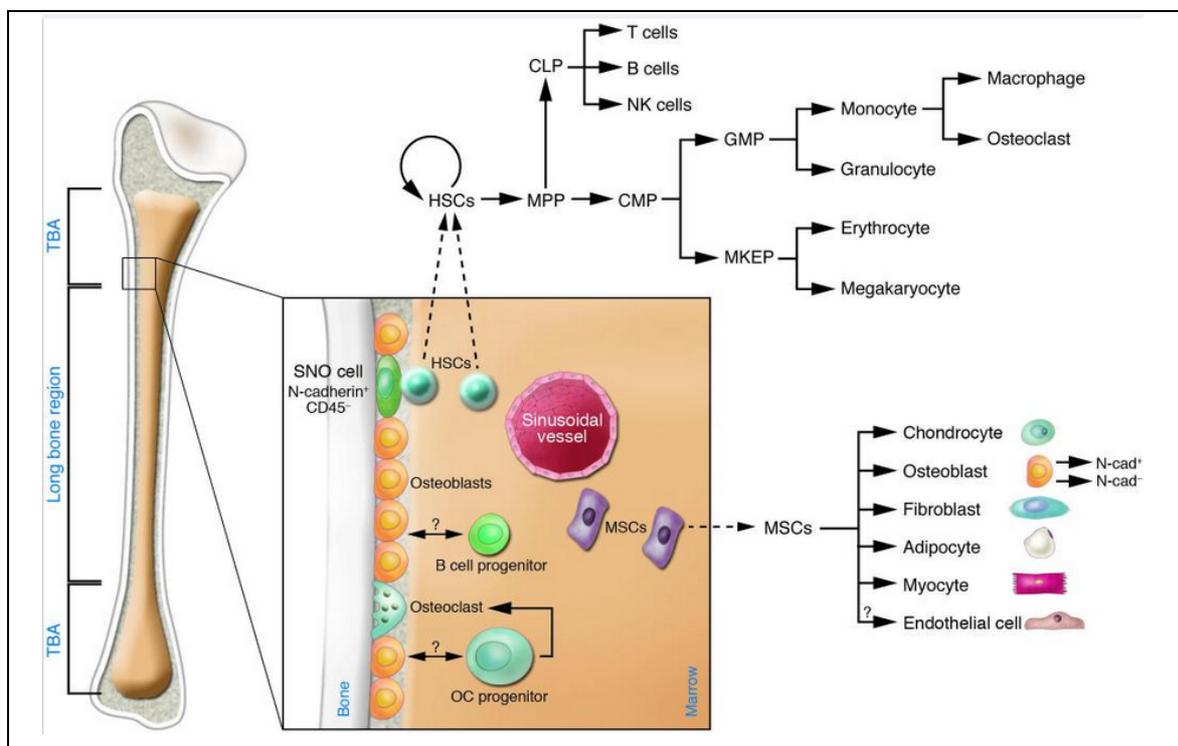
Las células madre son células indiferenciadas que pueden encontrarse en embriones, algunos tejidos fetales, cordón umbilical, placenta y en tejidos adultos. Son células pluri- o multipotenciales (en algunos casos totipotenciales) que pueden dar lugar a distintos tipos celulares, dependiendo de su origen y plasticidad. Las células madre embrionarias proceden de la masa celular interna del blastocisto. Sus características principales son la capacidad de renovarse a sí mismas indefinidamente (auto-renovación) y la capacidad de diferenciarse en las tres líneas germinales del embrión (ectodermo, mesodermo y endodermo) y, por lo tanto, en cualquier tipo celular (imagen 1). Este proceso de desarrollo está genéticamente controlado y la clave es la conversión de grupos de células multipotentes a células diferenciadas y altamente especializadas, estrechamente ligadas a la función del tejido (Caplan 2007) (16)



**Imagen 1.** Esquema del desarrollo embrionario

## INTRODUCCIÓN

Los estudios iniciales de Friedenstein y Owen (17,18) establecieron que la médula ósea contiene células que pueden dar lugar a un amplio espectro de tejido conectivo totalmente diferenciado. La médula ósea contiene tres tipos celulares fundamentales: células endoteliales, células troncales hematopoyéticas y células estromales. En 1976 Friedenstein et al. (19) aislaron de médula ósea células clonogénicas precursoras de fibroblastos (CFU-F), y observaron que podían formar colonias con capacidad para formar hueso y cartílago. Estudios posteriores han investigado los mecanismos que regulan esta diferenciación específica hacia una línea celular, particularmente hacia hueso y cartílago. En 1999 Pittenger et al. (20) mostraron que las células aisladas por aspiración de médula ósea eran capaces de permanecer en un estado de no diferenciación cuando se cultivaban in vitro durante largos periodos de tiempo y que las colonias aisladas de una simple célula podían ser inducidas a diferenciarse en líneas de células osteogénicas, adipogénicas y condrogénicas, cuando se las colocaba en un medio adecuado (imagen 2). A partir de entonces surgen trabajos con métodos de aislamiento celular y preparación de medios más homogéneos con la posibilidad de clonar células procedentes de colonias mesenquimales.



**Imagen 2.** Células troncales hematopoyéticas (HSCs) y células troncales mesenquimales (MSCs)(21).

## INTRODUCCIÓN

Según su origen y características las células madre las clasificamos en totipotentes, pluripotentes, multipotentes o unipotentes (tabla 2):

<b>Célula</b>	<b>Característica</b>	<b>Ubicación</b>
<b>Totipotente</b>	Origina a todo un organismo y sus anexos	Cigoto a mórula
<b>Pluripotente</b>	Origina cada capa embrionaria	Blastocisto
<b>Multipotente</b>	Produce células comprometidas al linaje de su capa embrionaria.	Endodermo, mesodermo, ectodermo
<b>Unipotentes</b>	Producen células sólo de una línea celular	Cada uno de los órganos, ej: dermis

**Tabla 2.** Origen y características de las células madre

### 1.2. Hematopoyesis

La hematopoyesis es el proceso por el que las células madre pluripotentes proliferan y se diferencian, de forma ordenada y controlada, para generar células progenitoras, precursoras y maduras. Las células hematopoyéticas independientemente de su linaje, linfoide o mieloide, derivan de un único progenitor pluripotente común (célula “stem”, troncal o madre, hematopoyética) que es capaz de auto renovarse, así como de diferenciarse progresivamente(22).

De acuerdo con el modelo de la hematopoyesis, el proceso de maduración de las células sanguíneas en la médula ósea comienza con un reducido grupo celular denominado células progenitoras hematopoyéticas de largo plazo (long-term hematopoietic stem cells, LT-HSC). Las LT-HSC son necesarias para el mantenimiento del sistema hematopoyético durante toda la vida de un organismo. Éstas dan origen a otro grupo celular denominado células progenitoras hematopoyéticas de corto plazo (short-term hematopoietic stem cells, ST-HSC), las cuales se caracterizan por su mayor cantidad, por entrar más fácil en el ciclo celular y dar origen a los progenitores comprometidos en la hematopoyesis (23,24). Las células hematopoyéticas evolucionan hacia el tipo celular final a través de una sucesión de estadios madurativos bajo el influjo del microambiente medular (imagen 3).

## INTRODUCCIÓN

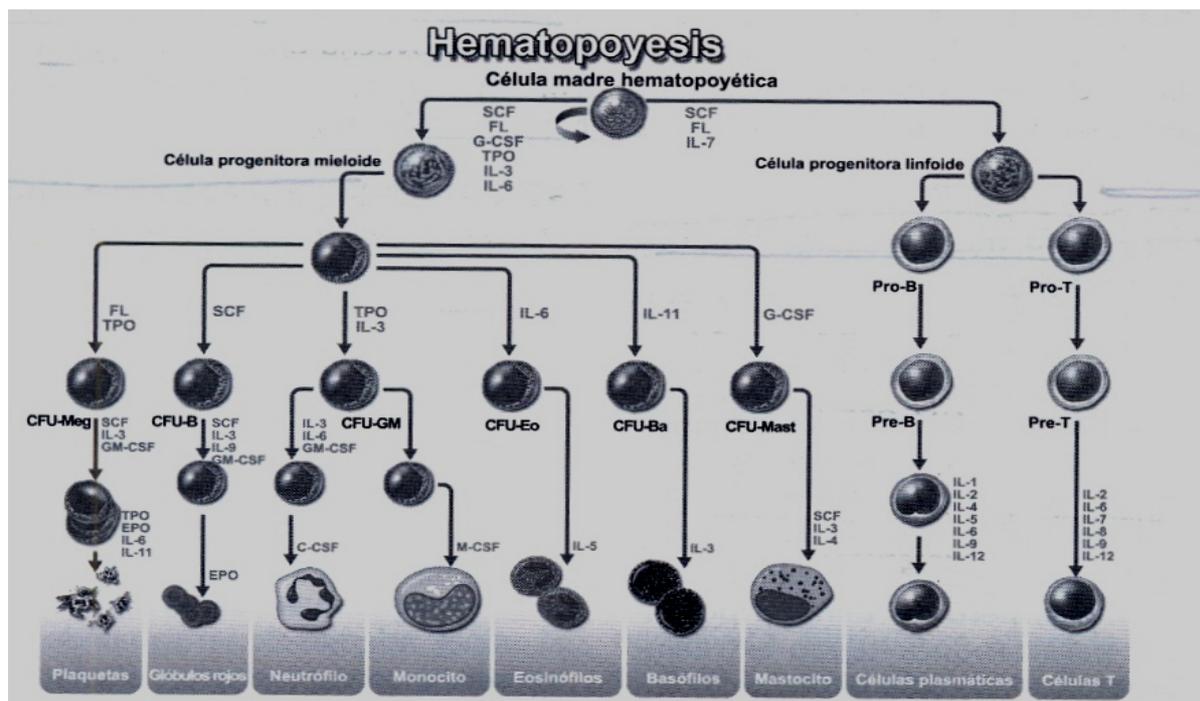


Imagen 3. Esquema general de la Hematopoyesis (25)

La transición desde el compartimento "stem" hasta el de célula progenitora (compromiso de linaje) se asocia a una disminución de las capacidades de autorenovación y proliferación, que se pierden cuando la célula progenitora se compromete a un linaje concreto (pérdida progresiva de capacidad de autorenovación) o inicia su maduración (pérdida progresiva de capacidad de proliferación) hacia un tipo celular hematopoyético concreto como el granulocito, monocito, etc.

Según el modelo de hematopoyesis actualmente admitido, podemos distinguir:(25):

- **Células progenitoras linfomieloides o UFC-LM:** capacidad de autorrenovación y diferenciación hacia la línea celular linfoides y mieloides. Son las verdaderas células madre o stem, y tienen capacidad de autorrenovación indefinida.
- **Células progenitoras con capacidad de diferenciación polivalente, pero sólo dentro de la línea** mieloides (UFC-GEMM) o linfoides (UFC-L): capacidad de autorrenovación muy limitada.
- **Células progenitoras comprometidas en su diferenciación** a cada una de las líneas celulares específicas, eritroide (BFU-E), granulomacrofágica (UFC-GM) o megacariocítica (UFC-Meg).

## INTRODUCCIÓN

- **Células precursoras:** morfológicamente reconocibles con microscopio óptico (mieloblastos, promonocitos, eritroblastos, megacariocitos, etc.).
- **Células maduras:** no tienen capacidad de división y son funcionalmente activas (leucocitos, hematíes y plaquetas).

La hematopoyesis en el ser humano se realiza en diferentes localizaciones anatómicas a lo largo del desarrollo embrionario. Sobre la tercera semana de gestación se desarrolla la hematopoyesis extraembrionaria a partir de las células mesenquimales del saco vitelino. Entre el segundo y el séptimo mes los lugares más importantes de producción son el hígado, el bazo, ganglios linfáticos y timo. A partir del séptimo mes de gestación, la médula ósea es el principal órgano hematopoyético. En el recién nacido, el tejido hematopoyético activo rellena las cavidades de todos los huesos y a partir de los 20 años se reduce a las vértebras, al esternón, a las costillas y a la pelvis.(25).

El microambiente medular engloba un conjunto de sustancias químicas, hormonales y diversos tipos celulares (células endoteliales, linfocitos T, macrófagos, células reticulares y adipocitos), entre otros varios factores menos conocidos. Cada tipo celular se desarrolla en un ambiente específico de la médula, denominado *nicho*, que está formado por elementos del microambiente que, además de intervenir en el proceso de diferenciación celular, ofrecen a la célula soporte físico y punto de adhesión (26). El concepto de “nicho” de células troncales fue introducido por primera vez por Schofield en 1978 (27) y hace referencia a la ubicación de un complejo estructural tisular microambiental con responsabilidad en la generación de células con actividad funcional (imagen 4).

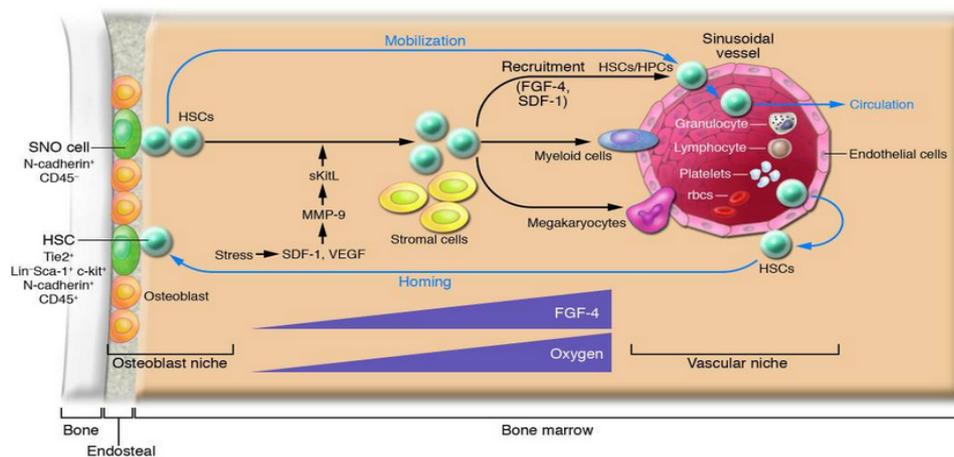


Imagen 4. Nicho osteoblástico y nicho vascular (21).

## INTRODUCCIÓN

Las HSC migran continuamente entre la médula ósea y la sangre en el adulto, pasando desde los cordones medulares hacia la circulación en los senos, que se comunican con los capilares intracorticales y drenan hacia la vena central. Esta migración representa la base del trasplante de médula ósea. Los fármacos que se utilizan en la movilización estimulan la salida natural de las HSC de la médula ósea al torrente circulatorio. Y el mismo proceso de injerto de las HSC que retornan a la médula ósea, favorecido por el acondicionamiento, permite la reconstitución exitosa de la hematopoyesis en los pacientes sometidos a trasplante (28).

El número de HSC circulantes está regulado por el sistema nervioso autónomo, de modo que los terminales nervioso simpáticos contactan en la médula ósea con células que expresan nestina y mediante la activación del receptor adrenérgico beta3, regulan la expresión de la quimiocina Cxcl12, estimulando así la migración de las HSC (29).

### **1.2.1. Células progenitoras hematopoyéticas (HSC)**

Los progenitores hematopoyéticos no son reconocibles mediante técnicas microscópicas ya que no poseen distintivos morfológicos precisos. Son células mononucleadas pequeñas, agranulares, parecidas a pequeñas células linfoides, cuya cuantificación se cifra en una por cada 2000 elementos medulares nucleados (0,05%) (30,31). Estas células pueden estudiarse mediante técnicas de cultivo in vitro, la marcación de sus antígenos de diferenciación con anticuerpos monoclonales y con el estudio de la efusión de colorantes fluorescentes tipo rodamina-123Rho y Hoescht 33342 (32). Con la ayuda de estas técnicas se sabe que existe una célula con capacidad de proliferación, diferenciación y autorrenovación, denominada célula madre pluripotente o stem cell y asimismo conocida como célula madre linfomieloide (CFU-LM). A partir de las CFU-LM aparecen la célula germinal linfoide (CFU-L) y la célula germinal mieloide (CFU-M) (33)

La célula germinal pluripotente mieloide, estimulada por el microambiente, da lugar a otras poblaciones comprometidas hacia la diferenciación de una o varias de las líneas mieloides, que pueden ser monopotentes, bipotentes o tripotentes (30–32). Estas células se denominan células formadoras de colonias (CFU-C) o unidad formadora de colonias (CFU).

## INTRODUCCIÓN

Las células progenitoras están englobadas dentro de una población medular muy heterogénea que se caracteriza por presentar el antígeno CD34<sup>+</sup> y, débilmente, el CD45. El marcador CD45 permite la identificación de todos los leucocitos y la diferenciación de las distintas poblaciones mediante la intensidad de expresión del marcador y la granularidad de las mismas (CD45<sup>+++</sup>-SSC bajo (linfocitos); CD45<sup>++</sup>-SSC intermedio (Monocitos), CD45<sup>+</sup>-SSC (granulocitos)). Estudios recientes sobre la composición bioquímica y estructural de la molécula CD34, incluido el de la secuencia de los aminoácidos y carbohidratos que la componen, han revelado que este antígeno es una molécula altamente glicosilada y ácida (punto isoeléctrico < 4,0), con peso molecular de 110.000 daltons (34). Otros experimentos indican que CD34 es una fosfoproteína. Puesto que los procesos relacionados con fosforilación están involucrados como un mecanismo que regula el funcionamiento de las glicoproteínas de superficie y de los receptores de los factores de crecimiento, este hecho podría dar una clave sobre el papel del CD34 como un regulador de los procesos hematopoyéticos (22). En definitiva, el CD34 es el marcador más utilizado para el conteo y aislamiento de PH, puesto que se expresa en las células progenitoras hematopoyéticas desde el nivel de célula madre hasta el estadio de progenitor comprometido, cuando pierde la capacidad de formar colonias in vitro (35).

Entre estas células CD34<sup>+</sup> se han identificado varios progenitores en diferentes estadios madurativos. Entre ellos la célula CD34 positiva, CD38 negativa y sin expresión HLA-DR, identificada como la célula madre común totipotente (32). La diferenciación de las células progenitoras se asocia con la pérdida de CD34 y con el inicio de la expresión de otros antígenos característicos de estadios de diferenciación más avanzados. La célula progenitora pluripotente mieloide (CFU-GEMM) expresa junto al CD34 el HLA-DR, adquiere el CD38 y es positiva para el CD33. Cuando se compromete hacia la línea granulomonocítica y pasa a CFC-GM, expresa además el CD13, antígeno que conserva durante toda su evolución hacia granulocito maduro. La línea monocítica tiene como marcador el CD14. Los progenitores eritroides BFU-E y CFU-E comparten el CD33 y el CD34, así como la glicoforina C. Los progenitores megacariocíticos CFU-Meg comparten el CD33 y el CD34 con el CD61 y el CD41, que se expresan durante toda su maduración. El antígeno HLA-DR se halla en estadios muy tempranos de la célula granulomono-eritromegacariocítica, y desaparece en estadios tempranos de diferenciación, excepto en la serie monocito-macrófago, en la que permanece hasta los elementos maduros (imagen 5) (33).

# INTRODUCCIÓN

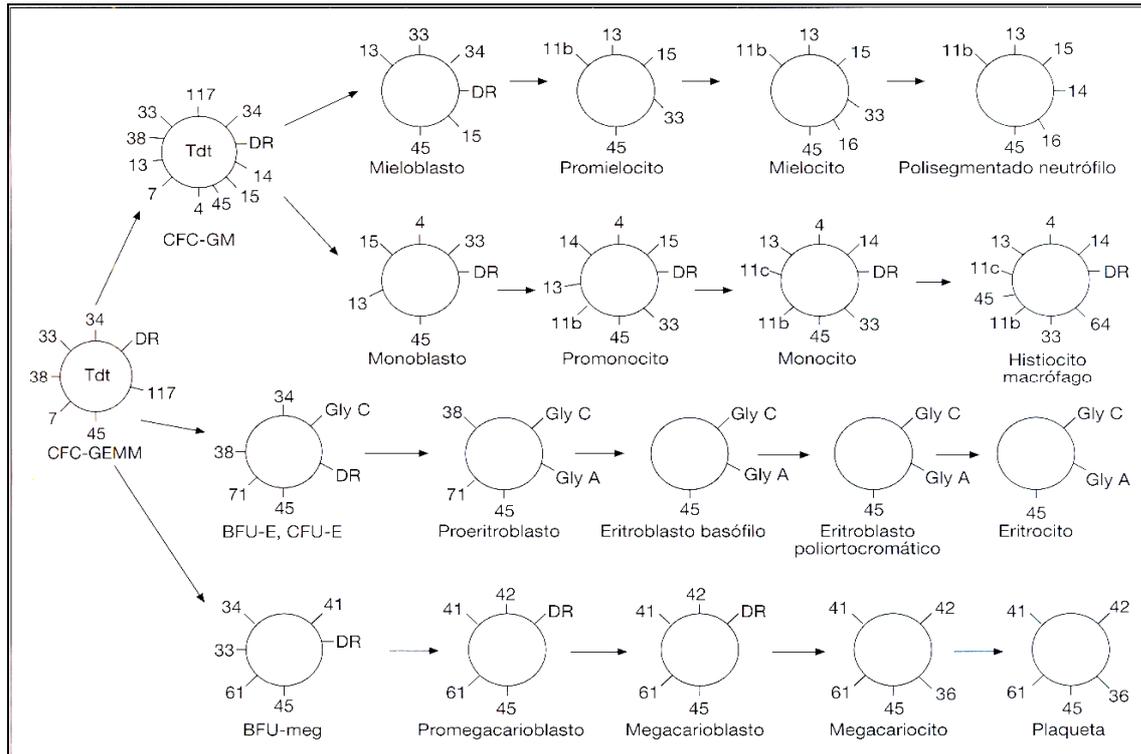


Imagen 5. Perfil Antigénico durante la hematopoyesis (33)

## 1.2.2. Mecanismos de regulación

La hematopoyesis está regulada por mecanismos de gran complejidad, en los que las células hematopoyéticas interactúan entre sí, con su microambiente, con factores de crecimiento y con la matriz extracelular. Estas interacciones coordinan la función de la célula y, para conseguirlo, requieren un amplio número de receptores en la superficie celular, muy especializados, que intervienen en la adhesión celular, así como en la transmisión de señales procedentes de otras células, de los factores de crecimiento y de la matriz extracelular (36).

Por otra parte, las células medulares secretan unas glucoproteínas denominadas factores de crecimiento que son indispensables para el desarrollo de las células hematopoyéticas. Estos factores pueden actuar sobre la proliferación, maduración y función celular. Entre los factores de crecimiento hay un grupo denominado "factores de supervivencia" que son los responsables de mantener la viabilidad y la supervivencia de las células madre. Estos factores no son capaces por ellos mismos de actuar en la proliferación de células madre hematopoyéticas. Sin embargo, su ausencia lleva a la muerte celular programada (apoptosis), mientras que su presencia preserva la viabilidad celular (36). Entre

## INTRODUCCIÓN

los factores de crecimiento hematopoyéticos se incluyen la eritropoyetina (EPO), la trombopoyetina (TPO), los factores estimulantes de colonias (FEC) y las interleucinas (IL) (tabla 3). Actualmente se sabe que su acción no está restringida a una línea celular, sino que la mayoría actúan de forma sinérgica entre ellos (36).

PROGENITORES CELULARES	FACTORES DE CRECIMIENTO REGULADORES
CFU-GEMM	SCF + IL-3, IL-6, GM-CSF, EPO
BFU-E	SCF + IL-3, GM-CSF, EPO
CFU-GM	SCF + G-CSF o M-CSF más GM-CSF, IL-3
CFU-G	SCF + G-CSF más GM-CSF, IL-3
CFU-M	SCF + M-CSF más GM-CSF, IL-3
CFU-Meg	SCF + IL-3, IL-6, TPO

**Tabla 3.** Acción de los factores de crecimiento sobre los progenitores hematopoyéticos.

CFU-GEMM: colony-forming unit - granulocytes, erythrocytes, monocytes and megakaryocytes; BFU-E: erythroid burst-forming unit; CFU-GM: granulocyte macrophage colony-forming unit; CFU-G: granulocyte colony-forming unit; CFU-M: monocyte colony-forming unit; CFU-Meg: megakaryocyte colony-forming unit; SCF: stem cell factor; IL-3: interleukin-3; IL-6: interleukin-6; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; EPO: erythropoietin; G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor; M-CSF: macrophage colony-stimulating factor; TPO: thrombopoietin.

Además de los factores de estimulación, participan en el mantenimiento de la hematopoyesis factores inhibitorios, los cuales intervienen en la producción celular normal y también evitan fluctuaciones cíclicas del sistema. Se reconocen varios factores inhibitorios (36,37):

- La proteína inflamatoria del macrófago (MIP-1 $\alpha$ ) presenta una capacidad muy potente para inhibir la proliferación de las células madre, evitando que entren en la fase S del ciclo celular (38).
- El factor transformador de crecimiento beta (TGF- $\beta$ ) que inhibe la proliferación de progenitores precoces (36).
- El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) también ejerce una acción inhibitoria en distintos progenitores hematopoyéticos.
- Otras moléculas como los interferones, las prostaglandinas y el factor 4 plaquetario también poseen acción inhibitoria, aunque sus efectos son indirectos y complejos(36).

## INTRODUCCIÓN

Algunas de estas sustancias están comercializadas 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). Otras 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.) (39).

### 1.2.3. Estroma medular

Las células del estroma medular ejercen su acción hematopoyética mediante el contacto directo con los progenitores, junto con la acción de las citocinas y las proteínas moduladoras de la matriz extracelular secretadas por ellas. El compartimento celular del estroma celular está dividido en tres categorías: el de las células madre mesenquimales que producen fibroblastos, adipocitos y osteoblastos, el de los monocitos/osteoclastos y el de las células endoteliales. La célula reticular (fibroblasto-fibrocyto) procede del mesénquima (40), por lo tanto es una célula no hematopoyética.

Los progenitores y precursores hematopoyéticos, para migrar de la médula ósea atraviesan la barrera endotelial de los sinusoides. Este proceso depende, en parte, de la interacción entre las células CD34<sup>+</sup> y las moléculas ICAM1 e integrinas que expresan las células endoteliales (36). Las células del estroma secretan unos componentes que forman la "matriz extracelular": fibronectina, laminina, colágeno y glucosaminoglucanos (sulfato de heparán) entre los más representativos.

En la hematopoyesis mediada por células del estroma se implican distintos mecanismos que pueden actuar por acción directa de los factores de crecimiento en las membranas de las células del estroma y por acción de los factores de crecimiento localizados en la matriz extracelular. En este último caso estos factores han sido previamente secuestrados por las moléculas de la matriz extracelular para después ser presentados a la célula hematopoyética diana.

Aparte de los factores de crecimiento, las moléculas de adhesión (MAC) y de asentamiento (homing) también participan en la regulación de la hematopoyesis. Éstas pueden ser moduladas por citocinas, y tienen un papel en la determinación de las interacciones entre las células del estroma y las células hematopoyéticas. Las moléculas de adhesión celular son glucoproteínas con secuencias de aminoácidos variables. Éstas han sido

## INTRODUCCIÓN

agrupadas en un pequeño número de superfamilias, entre las que se reconocen la superfamilia de las inmunoglobulinas (ICAM, CD3, CD4, MHC-I, MHC-II, etc.), la de las integrinas que intervienen en la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular, la de las selectinas (L-Selectina, E-selectina y P-selectina), la de las sialomucinas (CD34, CD43, etc.), las MAC dependientes de cationes y otras (33). Otras moléculas de adhesión como el factor derivado de la célula estromal (SDF-1 o CXCL12), miembro de la superfamilia de quimiocinas CXC ligando, se expresa constitutivamente en el estroma medular y su receptor el CXCR4 se expresa con intensidad en las células progenitoras hematopoyéticas. El 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 (41).

### **1.3. Caracterización de las células progenitoras**

#### **1.3.1. Contadores automáticos para los recuentos celulares**

Los contadores celulares constituyen la primera aproximación al conteo de PH por su disponibilidad inmediata y su reproductibilidad, ayudando a la toma de decisiones durante la recolección y en el procesamiento de los productos celulares, además de su utilidad para el posterior estudio por citometría de flujo. Pero, en contrapartida, son estimadores indirectos, poco sensibles y específicos.

Los PH no presentan características definidas que permitan distinguirlas de las poblaciones linfoides y monocitarias a través de contadores automáticos que no dispongan de un sistema de citometría con marcadores inmunológicos. 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 (39). No existe acuerdo sobre la forma más adecuada de cuantificar las CMN como estimador de calidad de un producto para trasplante.

#### **1.3.2. Recuento de células CD34<sup>+</sup> viables por citometría de flujo**

El parámetro que posee utilidad clínica es el número total de células CD34<sup>+</sup> vivas que serán infundidas. Para llevar a cabo su determinación la Sociedad Internacional de Hemoterapia e Ingeniería de Trasplantes (Siglas en inglés: ISHAGE) hace obligatoria la realización de cuatro mediciones: el volumen total de muestra disponible, el número absoluto

## INTRODUCCIÓN

de células nucleadas por unidad de volumen, el porcentaje de células CD34<sup>+</sup> del total de células nucleadas y el porcentaje de células viables (42,43). La determinación del porcentaje de células CD34<sup>+</sup> del total de células nucleadas presentes, representa una de las posibles fuentes de variabilidad del conteo de las células CD34<sup>+</sup>. La toma de una porción representativa global de la muestra para análisis y su posterior dilución para el conteo, pueden influir en los resultados finales, al introducir niveles elevados de variabilidad si no se realizan de forma controlada y estandarizada (42) .

La citometría de flujo constituye el método de elección empleado para el conteo del porcentaje de células CD34<sup>+</sup> respecto a la celularidad global. En la actualidad existen métodos disponibles para llevar a cabo de forma directa el conteo del número absoluto de células CD34<sup>+</sup> viables por unidad de volumen realizando las siguientes mediciones:

**a. Identificación específica de células CD34<sup>+</sup>:** para ello se considera la autofluorescencia de los monocitos y granulocitos y la unión inespecífica de anticuerpos tanto a células vivas como muertas. La selección del anticuerpo monoclonal y el fluorocromo más apropiados contribuye a mejorar de forma notable la discriminación entre marcaje específico y fluorescencia inespecífica. Con el fin de lograr una mejor discriminación de las verdaderas células CD34<sup>+</sup> se ha acordado emplear anticuerpos monoclonales anti CD34<sup>+</sup> de clase III conjugados con el fluorocromo más sensible de uso más extendido en la actualidad, la ficoeritrina (PE). Por otro lado, la expresión de proteína CD34 en precursores hematopoyéticos es heterogénea, siendo superior en la fracción celular más inmadura, ello hace que existan células que expresen débilmente el antígeno CD34, representando hasta la mitad o más del total de células CD34<sup>+</sup>. Ésta es la razón por la que se ha acordado contabilizar únicamente los precursores que expresan CD34 de alta intensidad con el fin de disminuir la variabilidad intra e interlaboratorios y facilitar la estandarización del conteo de células CD34<sup>+</sup> (44,45)

Para disminuir el conteo de eventos erróneamente positivos como células CD34<sup>+</sup>, se ha sugerido la utilización del marcaje simultáneo para el antígeno CD45, el empleo de fluorocromos de viabilidad celular de tándem ficoeritrina/ciananina 5 o de los parámetros de dispersión de luz (FSC/SSC), que excluiría el conteo de células muertas (45).

## INTRODUCCIÓN

**b. Contaje del número de células CD34<sup>+</sup> por unidad de volumen:** el contaje del número absoluto de células CD34<sup>+</sup> presentes en una muestra puede llevarse a cabo en dos mediciones distintas o en una sola. En la primera opción se calcula el número de células CD34<sup>+</sup> del total de células nucleadas presentes en la muestra y posteriormente se determina el número de células nucleadas por unidad de volumen, medición que habitualmente se realiza en un contador celular estándar. En la segunda opción los métodos habitualmente empleados utilizan un estándar interno consistente en un número conocido de microesferas fluorescentes añadido a un determinado volumen de muestra. Por medio de una regla de tres se calcula la concentración de células CD34<sup>+</sup> por unidad de volumen de la muestra a partir de la proporción relativa de células CD34<sup>+</sup> y de microesferas presentes en la muestra (45).

**c. Viabilidad celular:** se calcula midiendo las células dañadas, por medio de reactivos como la 7-aminoactinomicina (7-AAD), que puede medirse gracias a la permeabilidad aumentada de la membrana de las células no viables. Esta estrategia permite conocer el porcentaje de células CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, 7-AAD negativo.

Una de los inconvenientes que presenta la citometría de flujo es la dificultad para conseguir precisión y reproductibilidad (46). En este aspecto, las técnicas basadas en la selección de células según el forward scatter y el side scatter (Protocolo Nórdico) han mostrado su reproducibilidad y su valor clínico como predictores del injerto en TPH de sangre periférica, en estudios de intercomparación (47). Otros autores defienden la utilización de técnicas más complejas, como el protocolo ISHAGE, que incluyan selecciones celulares basadas en el marcaje del antígeno panleucocitario CD45 o en tinciones de ácidos nucleicos o de viabilidad citométrica (48). Este segundo método es el que poco a poco se ha ido imponiendo como estándar.

### 1.3.3. Cultivos de colonias granulomonocíticas y eritroides

Estos cultivos se basan en la siembra de un número determinado de células 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); para, tras un periodo de incubación aproximado de dos semanas, cuantificar el número de colonias de cada tipo que se genera. El tipo de colonias se identifica por su morfología o mediante tinciones inmunológicas (39); así, se puede detectar la presencia de unidades formadoras de colonias

## INTRODUCCIÓN

eritroides (UFC-E), macrófagas (UFC-M), granulocíticas (UFC-G), megacariocíticas (UFC-Meg), granulomacrófagas (UFC-GM), o granulo-eritromacrofago-megacariocítica (UFC-GEMM) (49). En la práctica clínica, las más utilizadas para estimar el número de progenitores hematopoyéticos son las UFC-GM (50), existiendo una correlación directa entre la dosis trasplantada y la cinética de injerto, independientemente de la dosis de células CD34+ (39).

Estas técnicas basadas en cultivos celulares constituyeron la base biológica de la cuantificación de progenitores en los primeros años de desarrollo del TPH (50).

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 (39,46,50,51).

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 "cobblestone area forming cells" (CAFC; "células formadoras de áreas de empedrado") (52) o "long term culture initiating cells" (LTCIC; "células iniciadoras de cultivos a largo plazo") (53). Estas técnicas estiman de forma mucho más específica la presencia de células madre. Sin embargo, son métodos complejos, con varias fuentes de potencial imprecisión y variabilidad, que precisan cinco o más semanas para obtener el resultado. 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 rutina clínica.

### 2. EL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

#### 2.1. Objetivos (54,55)

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) es un procedimiento terapéutico ya consolidado en la práctica clínica. El TPH tiene dos posibles objetivos: 1) la sustitución de la hematopoyesis del paciente por ser total o parcialmente defectuosa, insuficiente o neoplásica, por una normal procedente de un donante sano y 2) permitir la administración de agentes antineoplásicos en dosis elevadas, evitando una mielodepresión prolongada o irreversible mediante la administración de PH de rescate. Además, actualmente este procedimiento se utiliza con otros dos objetivos:

1/ Re-inicialización del sistema inmune como forma de corregir la auto-reactividad existente en diversas patologías autoinmunes.

2/ Frenar el depósito de inmunoglobulinas y otras sustancias responsables de las manifestaciones clínicas de diversas discrasias de células plasmáticas (amiloidosis, POEMS, escleromixedema, etc).

Adicionalmente, en el TPH a partir de progenitores de un donante sano, la celularidad inmunocompetente derivada del injerto es capaz de producir una reacción contra la neoplasia. Es decir, que es capaz de contribuir al efecto antitumoral especialmente en situaciones de enfermedad mínima residual.

#### 2.2. Indicaciones

La última guía, publicada en 2015, por la Sociedad Americana para trasplante de sangre y médula (**ASBMT**, American Society for Blood and Marrow Transplantation) (56–69) estableció las indicaciones del trasplante de progenitores hematopoyéticos Autólogo y Alogénico; en hemopatías malignas y no malignas, tumores sólidos y enfermedades autoinmunes, reseñadas en la tabla 4 para pacientes pediátricos y en la tabla 5 para pacientes adultos.

## INTRODUCCIÓN

\*Categorías de recomendaciones:

**Indicación estándar (S):** indicaciones bien definidas y generalmente sustentadas en ensayos clínicos de alta calidad y/o estudios observacionales (ej: a través de CIBMTR o EBMT)

**Evidencia clínica disponible (C):** el TPH ha demostrado ser una terapia eficaz con un riesgo aceptable de morbilidad y mortalidad en estudios de cohortes uni o multicéntricos lo suficientemente grandes, sin disponer de ensayos clínicos grandes ni de estudios observacionales. El TPH puede ser considerado una opción de tratamiento de forma individual tras una cuidadosa evaluación de los riesgos y beneficios.

**Indicaciones raras (R):** las indicaciones incluidas en esta categoría son las enfermedades raras para las cuales los ensayos clínicos y estudios observacionales no están disponibles actualmente debido a su muy baja incidencia. Sin embargo, existen registros o estudios uni/multicéntricos en pequeñas cohortes de pacientes que han demostrado el TPH como un tratamiento eficaz con riesgos aceptables de morbilidad y mortalidad.

**Desarrollo (D):** indicaciones de trasplante en las que existe poca experiencia y se requieren más estudios para establecer su eficacia. Estos trasplantes deben realizarse en el contexto de ensayos o estudios clínico

**No recomendado generalmente (N):** la evidencia clínica y la práctica no apoyan el uso rutinario de TPH. Esta recomendación no se opone a la investigación de TPH como un tratamiento potencial y se puede llevar a cabo en el contexto de un ensayo clínico.

## INTRODUCCIÓN

**Tabla 4.** Indicaciones TPH pacientes pediátricos (edad < 18 años)

Indicaciones y estado de la enfermedad	TPH Alogénico	TPH Autólogo
<b>Leucemia mieloide aguda</b>		
RC1, riesgo bajo	N	N
RC1, riesgo intermedio	C	C
RC1, riesgo alto	S	N
RC2+	S	C
No remisión	C	N
<b>Leucemia linfoblástica aguda</b>		
RC1, riesgo estándar	N	N
RC1, riesgo alto	S	N
RC2	S	N
RC3+	C	N
No remisión	C	N
<b>Leucemia mieloide crónica</b>		
Fase crónica	C	N
Fase acelerada	C	N
Fase blástica	C	N
<b>Síndromes mielodisplásicos</b>		
Riesgo bajo	C	N
Riesgo alto	S	N
Leucemia mielomonocítica juvenil	S	N
Secundarios a tratamiento	S	N
<b>Linfoma no Hodgkin células-T</b>		
RC1, riesgo estándar	N	N
RC1, riesgo alto	S	N
RC2	S	N
RC3+	C	N
No remisión	C	N
<b>Linfoma no Hodgkin Linfoblástico células-B (No Burkitt)</b>		
RC1, riesgo estándar	N	N
RC1, riesgo alto	S	N
RC2	S	N
RC3+	C	N
No remisión	C	N
<b>Linfoma de Burkitt</b>		
Primera remisión	R	R
Primera o más recaídas, sensible	R	R
Primera o más recaídas, resistentes	R	N
<b>Linfoma Hodgkin</b>		
RC1	N	N
Refractario primario, sensible	C	C
Refractario primario, resistente	C	N

## INTRODUCCIÓN

Primera recaída, sensible	C	C
Primera recaída, resistente	C	N
Segunda o más recaídas	C	C
<b>Linfoma Anaplásico de células grandes</b>		
RC1	N	N
Refractario primario, sensible	C	C
Refractario primario, resistente	C	N
Primera recaída, sensible	C	C
Primera recaída, resistente	C	N
Segunda o más recaídas	C	C
<b>Tumores sólidos</b>		
Tumor de células germinales, recaída	D	C
Tumor de células germinales, refractario	D	C
Sarcoma de Ewing, riesgo alto o recaída	D	S
Sarcoma de partes blandas, riesgo alto o recaída	D	C
Neuroblastoma, riesgo alto o recaída	D	S
Tumor de Wilms, recaída	N	C
Osteosarcoma, riesgo alto	N	C
Meduloblastoma, riesgo alto	N	C
Otros tumores cerebrales malignos	N	C
<b>Enfermedades no malignas</b>		
Anemia aplásica severa, nuevo diagnóstico	S	N
Anemia aplásica severa, recaída/refractaria	S	N
Anemia de Fanconi	R	N
Disqueratosis congénita	R	N
Anemia de Blackfan-Diamond	R	N
Enfermedad de células falciformes	C	N
Talasemia	C	N
Inmunodeficiencia combinada severa	R	N
Inmunodeficiencia de células T, variantes IDCS	R	N
Síndrome de Wiskott-Aldrich	R	N
Trastornos hemofagocíticos	R	N
Trastornos linfoproliferativos	R	N
Neutropenia congénita severa	R	N
Enfermedad granulomatosa crónica	R	N
Otros trastornos celulares fagocíticos	R	N
Síndrome IPEX	R	N
Artritis reumatoide juvenil	N	D
Esclerosis sistémica	N	D
Otros trastornos autoinmunes y desregulación inmune	R	N
Mucopolisacaridosis (MPS-I y MPS-VI)	R	N
Otros trastornos metabólicos	R	N
Osteopetrosis	R	N
Leucodistrofia flobloide (Krabbe)	R	N
Leucodistrofia metacromática	R	N
Adrenoleucodistrofia cerebral ligada al X	R	N

\*Categorías de recomendaciones: Indicación estándar (S); Evidencia clínica disponible (C); Indicación rara (R), En desarrollo (D); No recomendado generalmente (N).

## INTRODUCCIÓN

**Tabla 5.** Indicaciones TPH adultos (edad ≥ 18 años)

Indicaciones y estado de la enfermedad	TPH Alogénico	TPH Autólogo
<b>Leucemia mieloide aguda</b>		
RC1, riesgo bajo	N	C
RC1, riesgo intermedio	S	C
RC1, riesgo alto	S	C
RC2+	S	C
RC3+	C	C
No remisión	C	N
<b>Leucemia promielocítica aguda</b>		
RC1	N	N
RC2, remisión molecular	C	S
RC2, sin remisión molecular	S	N
RC3+	C	N
No remisión	C	N
Recaída tras trasplante autólogo	C	N
<b>Leucemia linfoblástica aguda</b>		
RC1, riesgo estándar	S	C
RC1, riesgo alto	S	N
RC2	S	C
RC3+	C	N
No remisión	C	N
<b>Leucemia mieloide crónica</b>		
Fase crónica 1, intolerancia ITK	C	N
Fase crónica 1, refractario ITK	C	N
Fase crónica 2 +	S	N
Fase acelerada	S	N
Fase blástica	S	N
<b>Síndromes mielodisplásicos</b>		
Riesgo bajo/intermedio-1	C	N
Riesgo intermedio-2/alto	S	N
<b>SMD/LMA secundarias a tratamiento</b>		
RC1	S	N
<b>Mielofibrosis</b>		
Primaria, riesgo bajo	C	N
Primaria, riesgo intermedio/alto	C	N
Secundaria	C	N
<b>Trastornos de células plasmáticas</b>		
Mieloma, respuesta inicial	D	S
Mieloma, recaída sensible	C	S
Mieloma, refractario	C	C
Leucemia de células plasmáticas	C	C
Amiloidosis primaria	N	C
Síndrome POEMS	N	R

## INTRODUCCIÓN

Recaída tras trasplante autólogo	C	C
<b>Linfoma de Hodgkin</b>		
RC1 ( PET negativa)	N	N
RC1 ( PET positiva)	N	C
Refractario primario, sensible	C	S
Refractario primario, resistente	C	N
Primera recaída, sensible	S	S
Primera recaída, resistente	C	N
Segunda o más recaídas	C	S
Recaída tras trasplante autólogo	C	N
<b>Linfoma difuso de células grandes B</b>		
RC1 (PET negativa)	N	N
RC1 (PET positiva)	N	C
Refractario primario, sensible	C	S
Refractario primario, resistente	C	N
Primera recaída, sensible	C	S
Primera recaída, resistente	C	N
Segunda o más recaídas	C	S
Recaída tras trasplante autólogo	C	N
<b>Linfoma Folicular</b>		
RC1	N	C
Refractario primario, sensible	S	S
Refractario primario, resistente	S	N
Primera recaída, sensible	S	S
Primera recaída, resistente	S	N
Segunda o más recaídas	S	S
Transformación a linfoma de alto grado	C	S
Recaída tras trasplante autólogo	C	N
<b>Linfoma del manto</b>		
RC1/RP1	C	S
Refractario primario, sensible	S	S
Refractario primario, resistente	C	N
Primera recaída, sensible	S	S
Primera recaída, resistente	C	N
Segunda o más recaídas	C	S
Recaída tras trasplante autólogo	C	N
<b>Linfoma células-T</b>		
RC1	C	C
Refractario primario, sensible	C	S
Refractario primario, resistente	C	N
Primera recaída, sensible	C	S
Primera recaída, resistente	C	N
Segunda o más recaídas	C	C
Recaída tras trasplante autólogo	C	N
<b>Linfoma Linfoblástico</b>		
RC1	N	N
Refractario primario, sensible	N	C

## INTRODUCCIÓN

Refractario primario, resistente	R	N
Primera o más recaídas, sensible	R	C
Primera o más recaídas, resistente	R	N
Recaída tras trasplante autólogo	C	N
<b>Linfoma de Burkitt</b>		
Primera remisión	R	R
Primera o más recaídas, sensible	R	R
Primera o más recaídas, resistente	R	N
Recaída tras trasplante autólogo	R	N
<b>Linfoma cutáneo de células-T</b>		
Recaída	C	C
Recaída tras trasplante autólogo	C	N
<b>Linfoma Plasmablástico</b>		
RC1	R	R
Recaída	R	R
<b>Leucemia linfática crónica</b>		
Riesgo alto, primera o más remisiones	C	N
Leucemia prolinfocítica células-T	R	R
Leucemia prolinfocítica células-B	R	R
Transformación a linfoma de alto grado	C	C
<b>Tumores sólidos</b>		
Tumor de células germinales, recaída	N	C
Tumor de células germinales, refractario	N	C
Sarcoma de Ewing, riesgo alto	N	C
Cáncer de mama, adyuvante en riesgo alto	N	D
Cáncer de mama, metastásico	D	D
Cáncer renal, metastásico	D	N
<b>Enfermedades no malignas</b>		
Anemia aplásica severa, nuevo diagnóstico	S	N
Anemia aplásica severa, recaída/refractaria	S	N
Anemia de Fanconi	R	N
Disqueratosis congénita	R	N
Enfermedad de células falciformes	C	N
Talasemia	D	N
Síndromes hemofagocíticos, refractarios	R	N
Enfermedades de células mastocíticas	R	N
Inmunodeficiencia común variable	R	N
Enfermedad granulomatosa crónica	R	N
Esclerosis múltiple	N	D
Esclerosis sistémica	N	D
Artritis reumatoide	N	D
Lupus eritematoso sistémico	N	D
Enfermedad de Crohn	N	D
Polimiositis-Dermatomiositis	N	D

\*Categorías de recomendaciones: Indicación estándar (S); Evidencia clínica disponible (C); Indicación rara (R), En desarrollo (D); No recomendado generalmente (N).

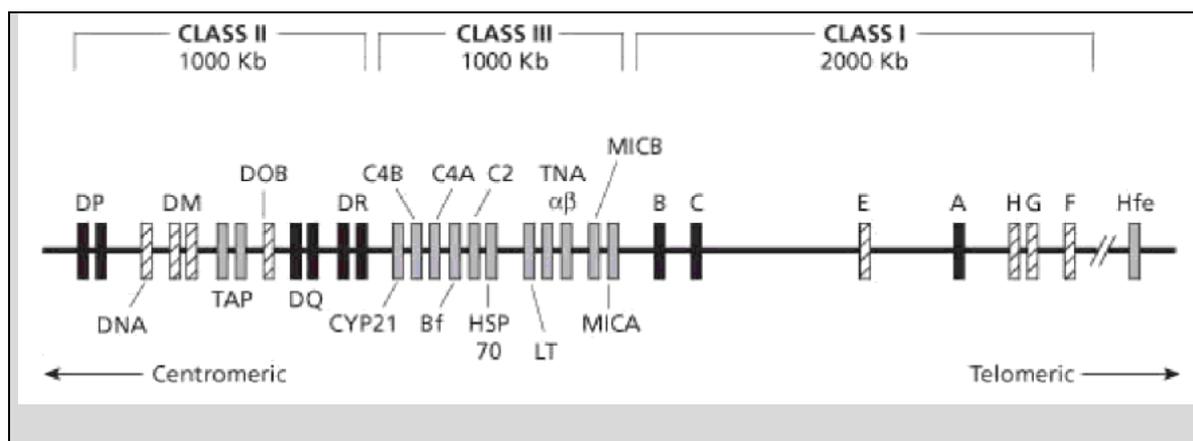
## INTRODUCCIÓN

### 2.3. Histocompatibilidad (55,70,71)

El sistema mayor de histocompatibilidad (MHC), también llamado sistema HLA, está formado por dos cadenas de ADN de 4 megabases localizadas en el brazo corto del cromosoma 6. La región 6p21.31 se encuentra organizada en varias subregiones denominadas de "clase I, II y III" (imagen 6).

Los antígenos del sistema HLA son glucoproteínas presentes en la membrana de las células nucleadas de todos los mamíferos. Las moléculas codificadas por los genes de esta región son fundamentales, entre otras, para la inmunidad innata y para el sistema inmune antígeno-específico. Los genes implicados en las funciones de procesamiento y presentación de antígenos con impacto en el TPH son los denominados HLA-A,-B,-C,-DR, y -DP. Las moléculas HLA de clase I (A, B y C) y clase II (DR, DQ, DP principalmente) son esenciales para controlar el reconocimiento de la histocompatibilidad en el TPH. Los genes de clase III localizados entre las regiones I y II codifican moléculas diversas y constituyen loci menores de histocompatibilidad.

La disparidad de estos antígenos entre donante y receptor se relaciona con el grado y la severidad de la EICH, así como con el rechazo del injerto. El sistema HLA se hereda con carácter mendeliano, es decir, se recibe 1 haplotipo de cada progenitor. Así, la probabilidad de tener un hermano compatible idéntico es del 25% y la probabilidad de que dos personas no emparentadas compartan el mismo HLA es de 1/50.000-100.000.



**Imagen 6.** Complejo mayor de Histocompatibilidad localizado en el brazo corto del cromosoma 6. (Tomado de Eric Mickelson & Effie W. Petersdorf, "Histocompatibilidad" capítulo 12. Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation.)

### 2.4. Tipos de trasplante de progenitores hematopoyéticos (3,72–74)

- **Según la fuente de progenitores:**
  - **Médula ósea:** los progenitores hematopoyéticos se extraen directamente de la médula ósea, mediante múltiples aspirados en crestas ilíacas posteriores, anteriores, esternón o meseta tibial (TMO).
  - **Sangre periférica:** las células stem se extraen mediante citoaféresis, a través de un catéter venoso. En condiciones habituales existe una mínima cantidad de células madre circulantes (CD34+), pero tras una estimulación adecuada -movilización- con quimioterapia o/y GCSF a dosis altas, se produce un pico transitorio de circulación de estos progenitores. El trasplante realizado con esta fuente se llama trasplante de sangre periférica (TSP) y, cuando los progenitores son autólogos, trasplante autólogo de progenitores de sangre periférica (TASPE).
  - **Cordón umbilical:** se recogen mediante punción de la vena umbilical inmediatamente después del parto. El principal inconveniente consiste en el escaso número de progenitores que se obtienen. La ventaja radica en que su trasplante permite un grado de incompatibilidad antigénica mayor que con los otros tipos de fuentes, aparte de la conveniencia de poder disponer de ellos casi de modo inmediato debido a su almacenamiento en bancos (TSCU).
- **Según el tipo de donantes (75)**
  - **Autólogo:** los progenitores hematopoyéticos proceden del propio paciente, previa extracción y criocongelación de los mismos. Se basa exclusivamente en la erradicación tumoral mediante dosis altas de QT/RT.
  - **Singénico o isogénico:** los progenitores hematopoyéticos proceden de un gemelo univitelino.
  - **Alogénico:** los progenitores hematopoyéticos proceden de individuos de la misma especie, distintos a gemelo univitelino. Puede ser emparentado (donante familiar, habitualmente HLA idéntico) o no emparentado (donante no familiar, no HLA idéntico). Según el grado de histocompatibilidad, distinguimos:

## INTRODUCCIÓN

- ALO-HLA idéntico:** trasplante alogénico de familiar HLA idéntico, o con identidad HLA 7/8 por alta resolución analizando los loci A, B, C, DRB1.
- ALO-Well matched:** donante no emparentado con compatibilidad 10/10 o 9/10 [diferencia en DQ], analizando los loci A, B, C, DRB1 y DQB1.
- ALO-Mismatched:** donante no emparentado con compatibilidad 8/10, siempre que al menos una diferencia esté en DQB.
- Haploidéntico:** trasplante a partir de donante haploidéntico, definido como aquel que comparte un haplotipo con el paciente y, en el otro, tiene más de 2 diferencias, considerando A, B, C, DRB1 y DQB1.

### 2.5. Movilización

Recibe el nombre de movilización el aumento del número de progenitores hematopoyéticos circulantes mediado por cualquier circunstancia.

En el adulto el número de PH circulantes en situación basal es muy reducido. Brown et al. encuentran una media de 4.3 células/ $\mu$ L en una muestra de 47 donantes sanos (76). En pacientes previamente tratados con quimioterapia estas cifras son habitualmente menores. Algunas circunstancias fisiológicas, como el ejercicio, producen un aumento moderado de los niveles de progenitores circulantes (77). En el ámbito del trasplante lo importante son los altos incrementos de PH circulantes que se producen durante la recuperación de una aplasia, tras ciertos ciclos de quimioterapia o tras la administración de determinadas citoquinas, que posibilitan su recogida mediante técnicas de citoféresis y, por tanto, su uso terapéutico (39).

El primer procedimiento de movilización que se explotó para su uso clínico fue la recuperación de una aplasia postquimioterapia, descrito por Richman a finales de los 70 (78). Sus principales inconvenientes son las complicaciones clínicas asociadas y la alta variabilidad en la dinámica de recuperación entre pacientes, lo que dificulta la programación de la recolección. En los años sucesivos se desarrollaron los procedimientos de movilización actuales, basados en la utilización de factores estimuladores de colonias hematopoyéticas, solos o en combinación con diferentes agentes quimioterápicos. La asociación de los agentes quimioterápicos con factores de crecimiento recombinantes, sea GM-CSF (79), G-CSF (80,81) o interleukina-3 asociada a GM-CSF (82), disminuyó la duración de las aplasias, mejoró la reproductibilidad de la dinámica de la movilización y consiguió movilizaciones más

## INTRODUCCIÓN

intensas. A finales de los 80 se describió el efecto movilizador del G-CSF administrado en una situación de hematopoyesis basal (83). Posteriormente, Sheridan et al. (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 esto aceleraba la dinámica de injerto respecto a controles históricos de TPH autólogo, con una cinética de movilización predecible, segura y prácticamente sin toxicidad. Más tarde se confirmó que este tipo de movilización incluye tanto progenitores con un grado intermedio de diferenciación, como progenitores inmaduros (83), siendo el número total de células CD34+ similar al obtenido en la combinación de quimioterapia con un factor de crecimiento (85,86).

Los mecanismos biológicos por los cuales las citoquinas inducen la movilización de progenitores hematopoyéticos son complejos y no se conocen con precisión (87). La citoquina más utilizada para la movilización es el G-CSF (88,89) y se ha demostrado que altera los mecanismos de adhesión de las células progenitoras al microambiente medular, promoviendo su salida hacia el torrente sanguíneo (77). En presencia de G-CSF, el número de células mieloides comprometidas a la línea granulocítica aumenta, lo que provoca la liberación de serín-proteasas activas de neutrófilos al microambiente medular, lo que a su vez, provoca la degradación de moléculas de adhesión y la liberación de células CD34+ a la sangre periférica. El pico máximo de liberación se produce en el quinto día tras la administración de G-CSF (90–93). Las dosis utilizadas cuando se administra sólo oscilan entre 10 y 20 microgr/kg/día sc repartidos en una o dos dosis, empezando al menos 4 días antes de la primera sesión de aféresis y continuando hasta la última sesión (90,94). Otro agente movilizador aprobado para la movilización de PH por la FDA y la EMEA es el Plerixafor (Mozobil®), antagonista selectivo y reversible de la citocina CXCR4 presente en la superficie de las células CD34+. El Plerixafor actúa alterando la interacción de esta citocina con su ligando (SDF-1), induciendo así la liberación de células madre hematopoyéticas a la circulación (95–97). La dosis recomendada es de 0,24 mg/kg de peso/día, iniciado 6 a 11 horas antes de iniciar cada aféresis y después de pretratamiento con G-CSF de 4 días de duración.

Para un injerto autólogo exitoso, está establecido que es necesario infundir un mínimo de  $2 \times 10^6$  células CD34+/kg de peso del receptor y para ello en muchos centros se ha establecido un dintel mínimo de células progenitoras circulantes previas al inicio de la aféresis, de entre 10 y 20 células CD34+/ $\mu$ L (98).

### 2.6. Recolección celular o aféresis

La palabra aféresis es un término derivado del griego “aphairesis” que significa “separar” o “remover”. Es un procedimiento que permite obtener hemocomponentes a partir de la sangre total, utilizando procesadores celulares automáticos (máquinas de aféresis) o semi-automáticos (centrífugas).

Los procesadores celulares de aféresis son capaces de separar componentes sanguíneos a escala clínica, de forma automática y en un sistema cerrado. Los PH reprecetan un porcentaje mínimo de los leucocitos (<1%, incluso después de una movilización satisfactoria), y es por eso que los programas de recolección de PH de SP intentan recoger toda la población de células mononucleadas, asegurando de esta manera la recolección de las células progenitoras.

Los procesadores considerados idóneos para la recolección de PH son los denominados de flujo continuo, ya que permiten 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 progresiva, disminuyendo los efectos secundarios. Estos sistemas utilizan simultáneamente durante todo el proceso dos accesos venosos, uno para extraer la sangre del paciente o donante y otro para devolvérsela sin el componente recogido. Estos procesadores de flujo continuo pueden procesar mayores volúmenes de sangre y obtener un mejor rendimiento que los de flujo discontinuo (39).

Las **reacciones adversas** relacionadas con el proceso de aféresis, se agrupan en tres categorías:

1. **Relacionadas con la vía de acceso.** Básicamente determinadas por hemorragias secundarias a la colocación de los catéteres. La infección es también un riesgo que puede llevar a complicaciones como bacteremia, endocarditis e incluso choque séptico.
2. **Relacionadas con el procedimiento.** Incluyen disminución del recuento de eritrocitos, plaquetas, niveles de proteínas (especialmente factores de coagulación), alteraciones de los líquidos corporales por el recambio constante entre el volumen intravascular y extravascular, hipotensión e incluso infarto de miocardio.

## INTRODUCCIÓN

3. **Relacionadas con el anticoagulante.** Es necesario utilizar en los procedimientos un anticoagulante, generalmente ACD (ácido cítrico, citrato, dextrosa) o heparina. El citrato es un quelante del calcio y puede producir hipocalcemia e hipomagnesemia, lo que favorece la aparición de parestesias y tetania. Los pacientes pediátricos, al igual que los que presentan insuficiencia hepática aguda, presentan una mayor toxicidad. Cuando se usa la heparina, para evitar complicaciones hemorrágicas en el caso de pacientes con alto riesgo de sangrado, se deben reducir las dosis habituales y vigilar los factores de la coagulación.

### 2.7. Criopreservación celular

#### 2.7.1. Introducción

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas (-196°C en nitrógeno líquido) durante periodos cortos de tiempo (aféresis, MO) o incluso durante décadas (SCU).

La estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación. Los períodos críticos para la supervivencia celular durante la criopreservación son la fase inicial de enfriamiento y el periodo de retorno a condiciones fisiológicas (99).

La membrana plasmática de la célula eucariota, independientemente de su composición, tiene una estructura organizada según el modelo de mosaico fluido (100). Estas membranas están compuestas básicamente de lípidos anfipáticos, proteínas y un pequeño porcentaje de carbohidratos.

Los lípidos (colesterol y ácidos grasos) como componentes más abundantes de la membrana plasmática, determinan la fluidez y resistencia de la membrana durante los procesos de criopreservación. 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 es el punto crítico para la supervivencia celular posdescongelación (101).

En las bicapas, los ácidos grasos de los fosfolípidos se posicionan en paralelo unos con otros mientras que el colesterol se intercala entre ellos. El empaquetamiento de las cadenas hidrofóbicas hace que interaccionen entre ellas y se estabilicen por fuerzas de van

## INTRODUCCIÓN

der Waals. La membrana será tanto más fluida cuanto más difícil sea este empaquetamiento. La presencia de moléculas de colesterol en la bicapa proporciona rigidez a temperaturas fisiológicas por la unión de sus anillos a las cadenas de ácidos grasos pero impide, por razones estéricas, que las cadenas de ácidos grasos se empaqueten libremente (cristalicen) al disminuir la temperatura, aumentando así de fluidez de membrana en ese momento (101).

En los procesos de congelación las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño como consecuencia, en general, de la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos. Los ácidos grasos pueden existir en un estado rígido ordenado (gel) o en uno más flexible y desordenado (fluido). La transición de un estado a otro se da en un rango de temperaturas, la media del cual se conoce como temperatura de transición de fase (Temperature Melting,  $T_m$ ) (102,103), que variará en función de la composición de los ácidos grasos que componen la membrana. La mayoría de las membranas de células eucariotas tienen su  $T_m$  entre los  $0^\circ\text{C}$  y los  $20^\circ\text{C}$  (104). Durante la deshidratación celular que tiene lugar en el proceso de congelación se puede presentar una pérdida de lípidos, lo cual afectaría la integridad de la membrana plasmática por pérdida de su capacidad de expansión durante la rehidratación al volver a condiciones isotónicas (105).

### **2.7.2. Fundamentos de criopreservación**

Las bajas temperaturas, asociadas al aumento de la rigidez de membrana, y la rapidez con la que suceden los cambios osmóticos en los procesos de congelación y descongelación dificultan el movimiento de moléculas a través de la membrana mediante procesos de transporte activo (dependientes de ATP), en consecuencia, son los procesos de difusión y ósmosis los que predominan en los momentos de estrés osmótico (106).

La difusión es un proceso mediante el cual las moléculas de una sustancia tienden a alcanzar una distribución homogénea en todo el espacio que les es accesible. La magnitud de la tendencia a difundir desde una zona a otra si existe una membrana que separe las dos zonas está definida por la Ley de difusión de Fick, que relaciona el gradiente entre las dos zonas y las características de la membrana (grosor, área de sección transversa y permeabilidad para un determinado soluto) (101).

La ósmosis es un caso especial de difusión en el que es el movimiento del disolvente el que se estudia y se define en función de los solutos. La ósmosis es el movimiento de agua

## INTRODUCCIÓN

desde soluciones con baja concentración de soluto hasta soluciones con alta concentración de soluto. La presión osmótica es la presión hidrostática que se genera a través de una membrana semipermeable con un gradiente de concentración al lado y lado y depende del número de partículas de la solución (101). La presión osmótica suele expresarse en osmoles y depende exclusivamente del número de partículas disueltas (moles) por unidad de volumen, con independencia de su carga eléctrica, peso o fórmula química. Es por tanto una propiedad coligativa (101).

Ejemplo de cálculo de osmolaridad en presencia de DMSO:

$$\text{Osmolaridad (mOsm/l)} = 300 + ((\text{mg/dl DMSO})/7.8)$$

Para una solución al 10% de DMSO la osmolaridad teórica será la suma de la osmolaridad del plasma más la debida a la presencia del crioprotector. Un 10% v/v de DMSO corresponde a una concentración molar de 1.4 M o 1400 mmol/litro;

$$\text{Osmolaridad (plasma al 10\% v/v DMSO)} = 1700 \text{ mOsmoles/L.}$$

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. Para evitar este cambio brusco de osmolaridad, 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 1:1 del material a congelar, hasta doblar su volumen. De esta manera se consigue mantener el volumen celular dentro de unos rangos de seguridad que no exceden sus capacidades mecánicas.

Los productos criopreservados se deben almacenar a temperaturas desde -133°C (vapores de nitrógeno líquido) a -196°C (nitrógeno líquido). A estas temperaturas no existen fenómenos de difusión ni energía térmica suficiente para llevar a cabo las reacciones químicas y consecuentemente, las dificultades de la congelación no derivan de la permanencia a temperaturas bajas sino de los procesos de congelación y descongelación (107).

El hielo se forma a diferentes rangos de temperatura. Durante un congelamiento lento el hielo se empieza a formar primero en el exterior de la célula y luego dentro de ésta. La formación de hielo provoca un desbalance osmótico a través de la membrana celular haciendo que el agua migre hacia fuera de la célula. Este proceso hace que aumente la

## INTRODUCCIÓN

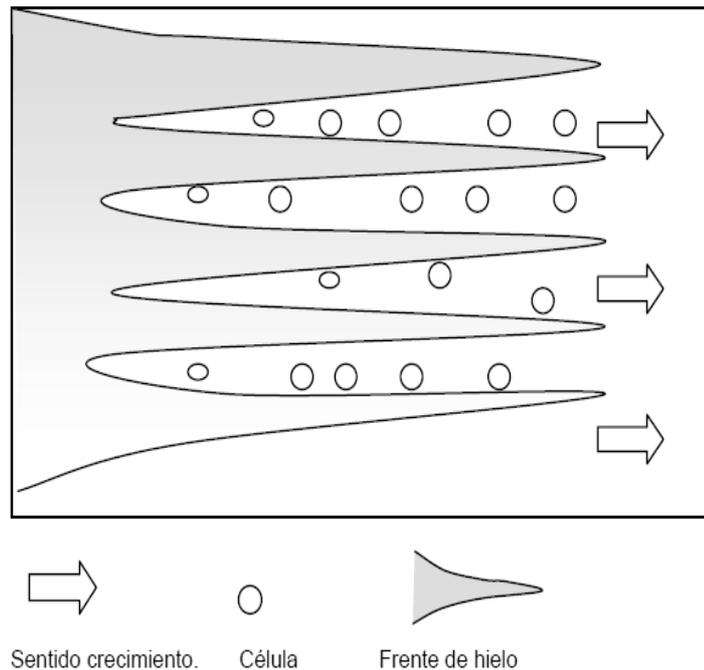
concentración de solutos extracelulares y también puede causar daño intracelular al deshidratarla por completo (108). La congelación rápida minimiza los efectos de concentración de solutos formando hielo uniformemente, sin embargo crea mayor hielo intracelular, el cual puede provocar la destrucción celular durante la descongelación, al hidratarse las células de nuevo, por exceso de agua en el interior celular (108).

Lovelock demostró que el tiempo en que las muestras pasan entre  $-3^{\circ}\text{C}$  y  $-40^{\circ}\text{C}$  es un factor crítico para que ocurra daño celular. Indicó que mantener las muestras a  $-45^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos no causa más daño que el ocurrido a  $-180^{\circ}\text{C}$ , sin embargo mantener las muestras por lo menos un minuto a  $-39^{\circ}\text{C}$  permite la destrucción total de las células (109).

Es importante para la viabilidad celular que antes de proceder a la disminución de la temperatura, se añada un crioprotector celular de manera progresiva con el objetivo de permitir que la concentración de éste se equilibre entre el exterior y el interior celular. Según Simione et al. este período de equilibrio entre el crioprotector y la solución puede variar, pero generalmente es aproximadamente de 15 minutos. Además este tiempo no debe exceder de 45-60 minutos, ya que el crioprotector puede ser tóxico para las células si el tiempo de estabilización es muy largo. También es importante que la adición del crioprotector se realice a temperatura ambiente si es glicerol (concentración final entre 5-20 % v/v) y a  $4^{\circ}\text{C}$  si es dimetil sulfóxido (DMSO) (concentración final de 5-15 % v/v) lo que permite que el crioprotector penetre en las células. La estabilización entre crioprotector y solución celular óptima se determina empíricamente dependiendo de las células y el tipo de crioprotector (108,110–112).

La solución de células se almacena en un congelador biológico y se enfría la mezcla paulatinamente. Durante el proceso de enfriamiento, entre los  $4^{\circ}\text{C}$  y los  $-10^{\circ}\text{C}$ , las células se someten a temperaturas menores que las de congelación de la solución que la circunda, pero tanto las células como el líquido extracelular se mantienen sin congelar (sobreenfriados) (Fig.8.II). Este es un estado metaestable donde la aparición de cristales de hielo entre los  $-10^{\circ}\text{C}$  y los  $-20^{\circ}\text{C}$  depende de la probabilidad de formación de centros de nucleación. Estos cristales crecen a medida que la temperatura disminuye en forma de frentes de congelación (imagen 7), entre los que las células se sitúan en canales de solución líquida aumentando su viscosidad a medida que el agua líquida pasa a formar parte de la fracción congelada (108,111,113).

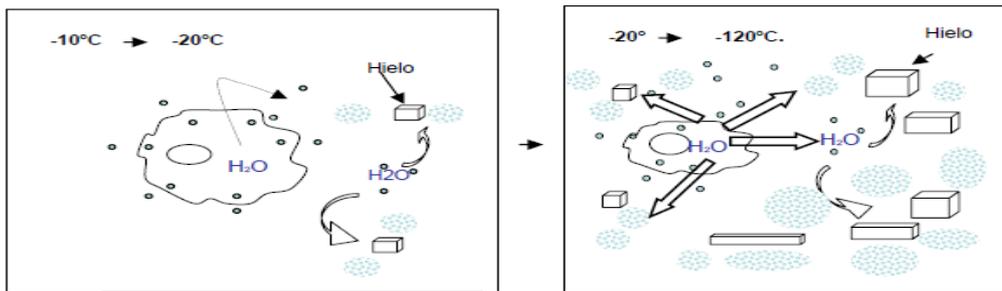
## INTRODUCCIÓN



**Imagen 7.** Esquema del frente de nucleación. Congelación en bolsa.

El hielo se forma preferentemente en la solución extracelular y al producirse la cristalización, las moléculas de agua se incorporan al hielo mientras que los solutos quedan excluidos de la fase sólida. De esta manera el espacio extracelular se va concentrando progresivamente (hipertónico) a la vez que el potencial químico del agua en el espacio extracelular decrece (imagen 8.1). En general, el potencial químico mide la tendencia de las partículas a difundirse. Las partículas tienen tendencia a difundirse desde regiones de alto potencial químico a regiones de bajo potencial químico (114), con lo cual se produce una salida de agua de la célula 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 el agua que exporta la célula se congela en el exterior (imagen 8 II) (108,111).

## INTRODUCCIÓN

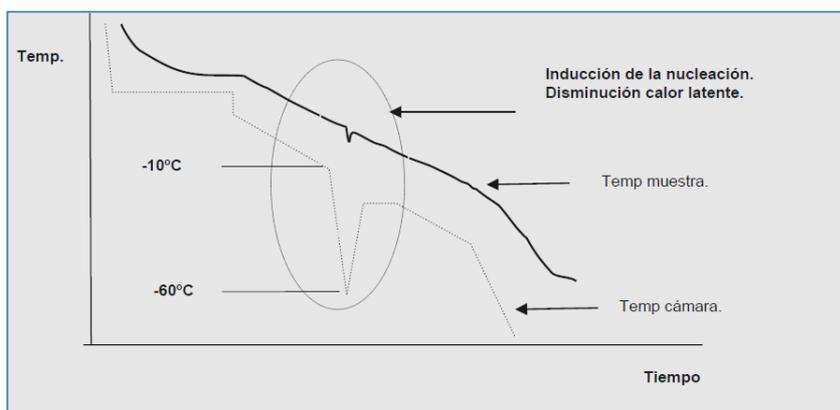


I. Nucleación, formación de hielo y aumento de la osmolaridad extracelular

II. Deshidratación celular en respuesta a la congelación.

**Imagen 8.** Representación esquemática de la respuesta celular a la congelación. Tomado de Rodríguez L. (111)

Los procesos de criopreservación se realizan mediante el uso de congeladores biológicos que enfrían las muestras según unas curvas programadas de congelación, que disminuye la temperatura 1°C por minuto hasta -40°C y luego 10°C por minuto hasta -80°C (imagen 9). 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. Las curvas programadas se componen de segmentos cada uno de los cuales tiene una velocidad de enfriamiento (°C/minuto) determinada empíricamente para obtener una máxima viabilidad tras el proceso de congelación. Tras alcanzar la temperatura de -120°C la suspensión se retira del congelador biológico y se almacena en la fase líquida de un tanque de nitrógeno líquido (-196°C) (108,111,115,116).



**Imagen 9:** Curva de congelación para PH. Inducción de la nucleación durante la congelación de CPH

## INTRODUCCIÓN

La velocidad de congelación fue ampliamente debatida en la literatura. La técnica de congelación con velocidad controlada todavía se considera estándar, debido principalmente al hecho de que la liberación de calor en la transición o punto eutéctico (alrededor de 4° C) se considera perjudicial para la población de células madre. En este punto las moléculas de agua dentro de la unidad congelada están en un orden molecular preciso, lo que condiciona una liberación termodinámica de calor de fusión (117). Para las células madre de cordón umbilical, de médula ósea y de sangre periférica, el proceso de congelación con velocidad controlada se considera estándar y en diferentes informes resultó ser superior a las técnicas de congelación no controlada (118–120).

La concentración celular utilizada en la mayoría de protocolos de criopreservación tiene como objetivo optimizar el espacio del almacenamiento (121). Teóricamente, la congelación de células a altas concentraciones puede resultar en bajas recuperaciones postdescongelación. Las causas serían el limitado espacio en los canales de solución no congelada y la presión física de las células en éstos debida al empaquetamiento. Por esta razón, desde la introducción de la sangre periférica como fuente de PH se recomendaron concentraciones de células nucleadas menores de  $100 \times 10^6$  CN/mL en los productos criopreservados (89,122). Posteriormente y con la intención de reducir costos y espacio en los procesos de criopreservación sin comprometer la eficiencia clonogénica, la recuperación ni la viabilidad de los PH, se realizaron estudios de funcionalidad postdescongelación y recuperación hematológica posinfusión con aféresis altamente concentradas (115,123). En estos trabajos se utilizaron concentraciones de  $243 \times 10^6$  CT/mL y  $370 \times 10^6$  CT/mL en los productos congelados. Aunque Keung (123) constató una pérdida de capacidad clonogénica en los productos descongelados, Rowley (115) y otros autores (124) 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.

### **2.7.3. Lesiones crioaducidas**

Según Mazur (99), los períodos críticos para la supervivencia celular durante la criopreservación son la fase inicial de enfriamiento y el periodo final de retorno a condiciones fisiológicas. Mazur postula que la lesión celular crioaducida podría ser

## INTRODUCCIÓN

consecuencia de la formación de hielo intracelular y del estrés osmótico, generado durante la deshidratación celular y al retornar a las condiciones fisiológicas de osmolaridad (99).

### **2.7.3.1. Formación de hielo**

En una solución sobreenfriada, fenómeno provocado gracias a la presencia de los crioprotectores, la formación de hielo depende de la probabilidad de formación de puntos de nucleación, lo cual es inversamente proporcional a la temperatura. Los cristales de hielo se pueden formar en el exterior y en el interior celular.

Con los congeladores biológicos programables, la nucleación se induce mediante un descenso brusco de temperatura en el interior de la cámara de congelación, con una doble función: por un lado iniciar la nucleación y, por otro, contrarrestar el calor producido por el cambio de estado del agua extracelular evitando fluctuaciones de temperatura sobre las membranas (111).

#### **a. Formación de hielo extracelular**

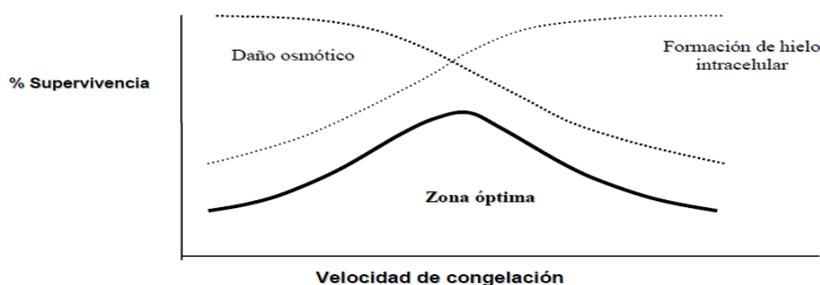
La formación de hielo en el espacio extracelular se da entre los  $-5^{\circ}\text{C}$  y los  $-10^{\circ}\text{C}$ , pero no se forma hielo dentro de la célula, posiblemente debido a la barrera física que impone la membrana celular al proceso de nucleación y al crecimiento de cristales de hielo (125). 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 congeladas mientras crecen los cristales de hielo en la solución extracelular sobreenfriada. Cuando la temperatura del medio alcanza los  $-130^{\circ}\text{C}$ , el agua no existe en estado líquido y los canales donde se encuentran las células se mantienen en estado vítreo y sin cristalización, estado en el que los fenómenos de difusión de las reacciones químicas no son posibles (111,126,127).

#### **b. Formación de hielo intracelular**

Si la velocidad de enfriamiento es muy rápida, la célula puede ser incapaz de deshidratarse lo suficientemente rápido y al llegar a la temperatura de nucleación, el agua remanente se congela formando hielo intracelular, que puede contribuir a la destrucción mecánica de la célula (127,128). Si por el contrario la velocidad de enfriamiento es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiendo llegar al colapso celular (daño osmótico) (129,130).

## INTRODUCCIÓN

Con una velocidad adecuada, la célula se deshidratará y concentrará intracelularmente antes de alcanzar la temperatura de nucleación, de forma que la posibilidad de hielo intracelular y daño celular será menor (99,127) (imagen 10).



**Imagen 10.** Naturaleza de los daños crioinducidos según la velocidad de congelación. Tomado de Rodríguez L (111)

### 2.7.3.2. Estrés Osmótico

Existen principalmente dos teorías para explicar el fenómeno de estrés osmótico durante la criopreservación, la de Lovelock y la de Merymann.

Lovelock atribuye el daño crioinducido como resultado de una alta concentración de solutos en el fluido extracelular (109). En 1953 lo demostró empíricamente basándose en que la hemólisis de eritrocitos durante la congelación empieza a ser evidente a partir de una concentración de solutos determinada (0.8M NaCl, 1600 mOsm/L). La adición de un crioprotector como el glicerol reduce la cantidad de hielo formado a una temperatura determinada y por tanto reduce la concentración de solutos en ese punto de la congelación. No obstante, independiente de la temperatura, se produce una lisis celular masiva al descongelar a partir de una concentración de 0.8M de NaCl (109). Los mecanismos propuestos son las interacciones del soluto iónico con las proteínas que producirían la desnaturalización de proteínas de membrana y/o facilitarían la formación de puentes disulfuros entre aminoácidos (131).

Los resultados se confirmaron cuando se utilizó glucosa como agente osmótico. El hecho de que la lisis celular se produzca independientemente de la concentración de soluto o de su naturaleza (azúcar o sal), apoya la teoría de que no es la concentración de soluto en sí lo que daña las células (la membrana celular es impermeable a la glucosa), sino la deshidratación

## INTRODUCCIÓN

celular que se produce. Mazur, considera que es la gran concentración salina que se alcanza durante la congelación la que altera la permeabilidad de la membrana aumentando el influjo de iones al interior celular, causando un efecto dañino (109,132).

De otro lado, Meryman (133) atribuye el daño a la contracción de la célula por debajo del volumen mínimo tolerable. Así, en el año 1971 propone la hipótesis del “volumen celular mínimo” que relaciona el efecto de la deshidratación producida durante la concentración de solutos y la lisis celular con la vuelta a las condiciones isotónicas, debido a que la hipertonicidad intracelular provoca una entrada masiva de agua (choque osmótico). El volumen celular mínimo se basa en que el volumen se reduce en relación al aumento de la osmolaridad extracelular, a medida que la célula pierde volumen por la pérdida de agua, la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen, y al excederse la resistencia física de la membrana se producirán cambios irreversibles en su permeabilidad (134). En este sentido los crioprotectores permeables, por sus propiedades coligativas, actuarían reduciendo la cantidad de hielo formado a una temperatura determinada y por tanto de soluto durante la congelación, reduciendo la deshidratación celular (133)

En conclusión, la supervivencia celular a la congelación será máxima a una velocidad de enfriamiento óptima, específica para cada tipo celular y velocidades mayores o menores aumentan la muerte celular por la formación de hielo intracelular y el daño osmótico resultante de la concentración de solutos.

### **2.7.4. Crioprotectores**

Son sustancias muy hidrosolubles y de baja citotoxicidad que disminuyen el punto eutéctico de una solución determinada (temperatura mínima a la que una solución se encuentra en estado líquido). 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 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 congele (111). Mejoran la viabilidad celular alterando el comportamiento fisico-químico de las soluciones acuosas en las cuales tiene lugar la criopreservación y ayudan a proteger las células del daño causado por la formación de hielo intracelular.

## INTRODUCCIÓN

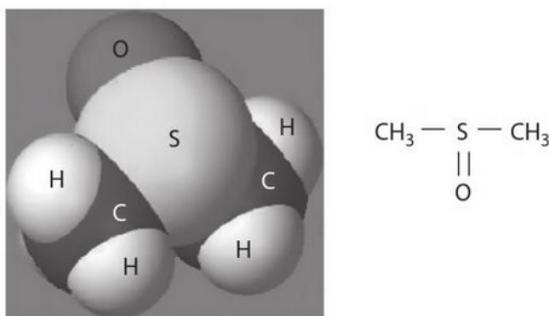
Los crioprotectores pueden clasificarse en agentes penetrantes y no penetrantes, según sean o no permeables a través de la membrana celular (135).

- Los **ACP penetrantes**: son moléculas de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular. Protegen a la célula de las lesiones producidas por las congelaciones a velocidad lenta. Ejemplos: 1,2-propanediol (PROH), dimetil sulfóxido (DMSO), etilenglicol (EG), glicerol, metanol y otros alcoholes (111,136).
- Los **ACP no penetrantes**: son moléculas de alto peso molecular y no permeables. Protegen a la célula cuando se utilizan velocidades altas de congelación. Ejercen su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Ejemplos: sacarosa, glucosa, dextrosa, hidroxietil almidón (HES, hydroxyethyl starch), la polivinilpirrolidona (PVP) y el polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico, hialuronidato de sodio y otros polímeros. (111,136). Son compuestos que forman puentes de hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad de agua a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar.

La adición de ACP ejerce per se 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.

### 2.7.4.1.DMSO

El DMSO ( $C_2H_6SO$ ) es el crioprotector más utilizado en la congelación de PH de cualquier fuente (137) (imagen 11).



**Imagen 11.** Estructura molecular del dimetil sulfóxido.

## INTRODUCCIÓN

El dimetil sulfóxido (DMSO,  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ ) es un solvente bipolar aprótico, hidrosoluble, de bajo peso molecular. Se ha usado como disolvente orgánico industrial a partir de 1940 y como crioprotector desde el descubrimiento de sus propiedades crioprotectoras por Lovelock en 1959 (109). Fue sintetizado por primera vez en el año 1866, siendo comunicado un año más tarde por el químico orgánico ruso Saytzeff (138). El dimetil sulfóxido se obtiene como subproducto durante el procesamiento de la madera en la fabricación de pulpa de celulosa.

Características del DMSO: es líquido, incoloro e inodoro, con una densidad de 1108 g/cm<sup>3</sup> y un peso molecular de 78,13 g/mol. Su vida media en plasma es de 20 horas. Como resultado del metabolismo del DMSO se genera DMSO<sub>2</sub> (sulfato de dimetilo), el cual tiene una vida media de 72 horas y es excretado por vía renal (139). Otra pequeña proporción del DMSO se reduce a DMS (sulfuro de dimetilo), que se excreta a través de la respiración durante las primeras 24 horas postinfusión.

La concentración óptima del DMSO utilizado para la criopreservación de progenitores hematopoyéticos parece ser la de un 10% v/v, aunque también han sido publicadas concentraciones del 5% v/v (140) y combinaciones con HES (5-6%) con buenos resultados posdescongelación (141). El HES 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.

Su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad para prevenir la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelación, así como la prevención de la formación de cristales de hielo gracias a su capacidad de ligar moléculas de agua, reduciendo el agua disponible para los cristales. Por otra parte, su viscosidad aumenta de forma importante al descender la temperatura, lo que hace difícil la formación de una estructura cristalina y favorece la vitrificación. Su bajo peso molecular permite la entrada rápida a través de la membrana celular, modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos, así como también afecta a los procesos de solvatación de agua (142). Pero el DMSO, tiene un efecto tóxico sobre la célula a temperatura ambiente, por lo que es necesario 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.

## INTRODUCCIÓN

La toxicidad del DMSO puede ser clasificada en dos grupos: toxicidad química celular y toxicidad asociada con la infusión:

- **Toxicidad química celular:** los resultados experimentales publicados son contradictorios. Aunque existe la creencia generalizada de que el DMSO es tóxico a temperatura ambiente y no a 4°C, diversos autores aportan resultados a favor y en contra de esta teoría. Así, en el año 1978 Goldman et al.(143) publican que la capacidad clonogénica en MO descongelada disminuye en presencia de un 10% de DMSO. Además demuestran como prevenir este efecto realizando una dilución volumen: volumen en salino; lo cual les sugirió que la hiperosmolaridad y el efecto del choque osmótico secundario son responsables de este fenómeno.

Rowley et al. (144) estudiaron la toxicidad química del DMSO sobre los PH de donantes sanos no criopreservados. No encontraron toxicidad a concentraciones del 5 o 10% de DMSO, ensayado a temperaturas de 4°C y 37°C, durante periodos de incubación de hasta 1 hora. Con concentraciones del 20% de DMSO, tampoco objetivaron descenso del número de colonias clonogénicas, pero sí que ocasionó la formación de agregados celulares durante el lavado del DMSO, lo que resultó en una pérdida neta de células progenitoras. A concentraciones del orden del 40% encontraron una toxicidad directa sobre los PH. En PH sometidos a congelación, tampoco demostraron toxicidad del DMSO cuando su eliminación se pospuso hasta 1 hora tras la descongelación. Estos datos sugieren que el DMSO no es tóxico para las células PH tras la exposición a corto plazo a las concentraciones utilizadas para la crioconservación de células madre de médula y de sangre periférica.

En el año 1994 Branch et al. (145) corroboraron y ampliaron dichos resultados, constatando que la exposición de PH de MO descongelada a un 8% de DMSO durante un intervalo de 2 horas no tiene un efecto significativo en la recuperación de colonias.

Recientemente Rodríguez L et al.han publicado un trabajo (146) donde valoran el efecto del DMSO en muestras descongeladas a lo largo del tiempo, evaluándolo en muestra pareadas de CPH-A lavadas y no lavadas tras la descongelación. Reportando que la presencia del DMSO redujo el recuento (50%), la recuperación clonogénica (60%) y la viabilidad de los PH a tiempos de una a dos horas tras el lavado aún cuando las muestras se conservaron a 4°C. La recuperación de CPH y CFU de las mismas muestras, pero en las que se había eliminado el DMSO, fue del 70%. Concluyendo que la eliminación del crioprotector en PH descongelados es beneficiosa para la conservación ex vivo del injerto a medio-largo plazo.

## INTRODUCCIÓN

En definitiva, los resultados de recuperación de colonias clonogénicas de un componente celular de PH descongelado podrían estar más relacionados con la hiperosmolaridad y más concretamente con el cambio brusco de ésta, que con la toxicidad directa del DMSO, por lo menos en periodos de exposición a corto plazo, aunque las condiciones de osmolaridad sí parecen ser deletéreas a largo plazo.

- **Toxicidad asociada a la infusión:** está aceptado que esta toxicidad es dependiente de la dosis del crioprotector administrado durante la infusión (5–7). Las complicaciones van desde mareos, hasta fallos renales agudos y paradas cardíacas. Las más frecuentes, sin embargo, son las náuseas, el vómito, el dolor abdominal y los escalofríos (8,9). Estos síntomas desaparecen después de la infusión. También se han asociado a la administración de DMSO otras complicaciones como las variaciones de la presión sanguínea, la disnea y la toxicidad cardíaca (147,148). Son menos frecuentes las complicaciones neurológicas (149), así como los episodios de amnesia global transitoria. Estos sugieren que la infusión de DMSO podría provocar isquemias cerebrales severas, secundarias a una toxicidad neurológica grave, como ya se había reflejado anteriormente en trabajos fuera del contexto de TPH (150). En la tabla 6 están detallados el tipo de reacciones adversas y su incidencia

Por otra parte, la aparición de estas complicaciones puede estar influenciada por otros factores como la infusión de restos celulares y de citoquinas provenientes de las células muertas o dañadas. También se ha sugerido que los restos celulares y la baja temperatura de los productos hematopoyéticos infundidos podrían por sí mismas provocar respuestas vagales, alteraciones electrolíticas locales y expansiones de volumen que podrían dar origen a las complicaciones cardiovasculares durante la infusión de los PH descongelados (148,151). Por tanto, la patogénesis de muchas de las complicaciones observadas durante la infusión de CPH descongelados puede ser multifactorial.

## INTRODUCCIÓN

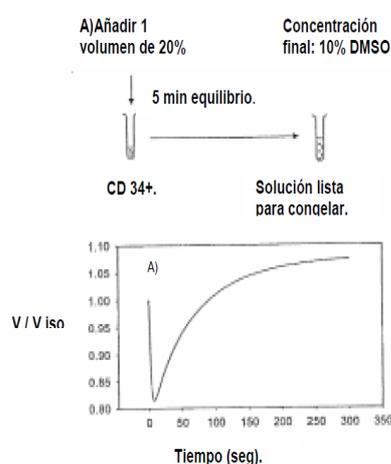
Categoría RA	Síntomas	Referencias	Incidencia RA
<b>Alergias</b>	Enrojecimiento, picor, prurito, eritema	(10,152-158)	<b>Cordoba</b> (159): 67,36% RA:  43,75% reacción alérgica 25% gastrointestinales  20,83% respiratorios 11,81% cardiovascular  3,47% neurológicos  <b>Kersting</b> (165): 0-29% nefropatía
	Edema, anasarca	(154,160)	
	Broncoespasmo	(161)	
<b>Gastrointestinales</b>	Dolor de cabeza	(8,152,154,160,162,163)	<b>Donmez</b> (160): 25,25% RA:  7,73% cardíacas  1,54% bradicardia sinusal  15,97% RA no cardíacas
	Opresión torácica, disnea	(152,158,163,164)	
	Calambres/dolor abdominal, distrés gastrointestinal, diarrea	(8,152,154,155,157,158,160,161,165,166)	
	Náuseas, emesis, vómitos	(152,154,155,160,165-168)	
<b>Renal</b>	Hemoglobinuria, proteinuria, azotemia leve, SHU	(8,157,169)	<b>Konuma</b> (163):  58% HTA sistólica, 64% HTA diastólica  32% bradicardia  <b>Alessandrino</b> (5):  8% complicaciones no cardíacas  57,33% cardíacas (36% HTA)  <b>Zambelli</b> (179): 50% RA:  22% hipotensión  4,54% hipertensión  4,5% bradicardia  <b>Hazar</b> (180): en niños  34-50% insuficiencia renal en fases tempranas  41%, 31% y 11% , 1, 3 y 7 años tras la infusión respectivamente  <b>Graves</b> (181): 0,4% RA severas, 50% no cardíacas  <b>Keung</b> :(148)  65% bradicardia sinusal 29,41% bloqueo cardíaco 41% hipertensión 82% arritmias  <b>López-Jiménez</b> (6): 41% RA no cardíacas
	Incontinencia urinaria	(170,171)	
	Trombocitopenia, anemia hemolítica	(165,169)	
	Insuficiencia renal, nefropatía, fallo renal agudo	(10,165,169,172)	
<b>Cardiovascular</b>	Hipotensión, hipertensión	(5,148,152,154-156,158,160,161,165-167,173)	<b>Konuma</b> (163):  58% HTA sistólica, 64% HTA diastólica  32% bradicardia  <b>Alessandrino</b> (5):  8% complicaciones no cardíacas  57,33% cardíacas (36% HTA)  <b>Zambelli</b> (179): 50% RA:  22% hipotensión  4,54% hipertensión  4,5% bradicardia  <b>Hazar</b> (180): en niños  34-50% insuficiencia renal en fases tempranas  41%, 31% y 11% , 1, 3 y 7 años tras la infusión respectivamente  <b>Graves</b> (181): 0,4% RA severas, 50% no cardíacas  <b>Keung</b> :(148)  65% bradicardia sinusal 29,41% bloqueo cardíaco 41% hipertensión 82% arritmias  <b>López-Jiménez</b> (6): 41% RA no cardíacas
	Arritmia/bradicardia, taquicardia	(8,148,154,155,158,160,161,163,167,168,172,174,175)	
	Hipotermia, hipertermia	(152,160,166,169,172)	
	Rigidez, temblores	(160,169,173)	
	Isquemia, hipoxia	(156,168,173)	
	Sincope, coma, somnolencia, shock, pérdida de consciencia, trismo	(149,153,156,168,170,176,177)	
	Paro respiratorio, insuficiencia respiratoria, paro cardíaco, espasmo arterias coronarias	(7,10,153,154,156,157,161,166-168,176,178)	
	Convulsiones	(152,153,165,167,172,176,177)	
	Bloqueo cardíaco	(148,154,155)	
<b>Hepático</b>	Ictericia progresiva	(10,169)	<b>Hazar</b> (180): en niños  34-50% insuficiencia renal en fases tempranas  41%, 31% y 11% , 1, 3 y 7 años tras la infusión respectivamente  <b>Graves</b> (181): 0,4% RA severas, 50% no cardíacas  <b>Keung</b> :(148)  65% bradicardia sinusal 29,41% bloqueo cardíaco 41% hipertensión 82% arritmias  <b>López-Jiménez</b> (6): 41% RA no cardíacas
<b>Neurológico</b>	Midriasis, miosis, disartria, infarto talámico bilateral, visión borrosa, desviación ocular	(153,167,170,171,176)	<b>Hazar</b> (180): en niños  34-50% insuficiencia renal en fases tempranas  41%, 31% y 11% , 1, 3 y 7 años tras la infusión respectivamente  <b>Graves</b> (181): 0,4% RA severas, 50% no cardíacas  <b>Keung</b> :(148)  65% bradicardia sinusal 29,41% bloqueo cardíaco 41% hipertensión 82% arritmias  <b>López-Jiménez</b> (6): 41% RA no cardíacas
	Disgeusia	(157)	
	Leucoencefalopatía reversible, encefalopatía severa	(156,171-173,177)	
	Afectación SNC	(10,153)	
	Amnesia global transitoria	(168,171,176,182)	
	Infarto cerebral	(168,182)	
	Problemas cognitivos	(168,171,173)	
	Debilidad muscular	(171,173)	
Ansiedad	(10,169)		

**Tabla 6.** Reacciones adversas (RA) tras trasplante de PH. Modificado de Z Shu et al. (183)

## INTRODUCCIÓN

### 2.7.4.1.1. Respuesta volumétrica celular a la adición y extracción del crioprotector

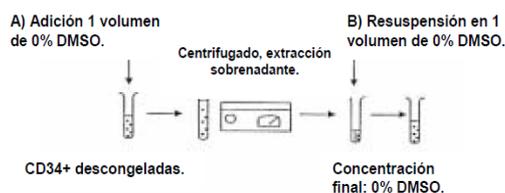
- ▶ **Adición del crioprotector:** La adición de DMSO a una suspensión celular se realiza mediante una dilución 1:1 en una solución al 20% vol/vol que provoca inicialmente una deshidratación celular muy rápida por el aumento de solutos en el medio. Esta situación se revierte cuando el ACP se equilibra a ambos lados de la membrana celular. Tras cinco minutos de equilibrio y a causa del aumento de soluto en el interior celular, existe un ligero incremento del volumen celular respecto al volumen en condiciones isotónicas (imagen 12)



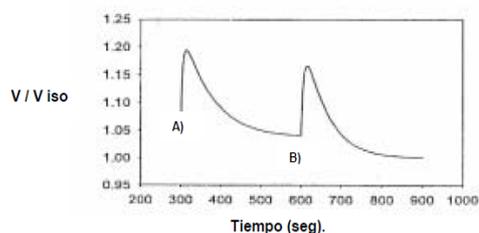
**Imagen 12.** Variaciones de volumen celular asociados a la adición de un 10% v/v DMSO a Temperatura ambiente

- ▶ **Extracción del crioprotector:** La extracción del crioprotector se basa en la dilución 1:1 de la suspensión celular descongelada en un medio ligeramente hipertónico sin DMSO. Con esta dilución se reduce la concentración de DMSO extracelular un 5% (10% en el interior celular) y provoca la entrada de agua en la célula, aumentando el volumen celular. En los cinco minutos posteriores, el DMSO tiende a equilibrarse entre el interior y el exterior celular, por lo que sale de la célula junto con moléculas de agua. Posteriormente se centrifuga, se retira el sobrenadante y se diluye en medio sin DMSO. Ahora la concentración de DMSO será del 0% en el exterior celular y del 5% en el interior celular, volviéndose a repetir el paso de hidratación celular y el equilibrio posterior. El proceso se puede repetir hasta alcanzar una concentración de 0% DMSO en el interior celular (imagen 13).

## INTRODUCCIÓN

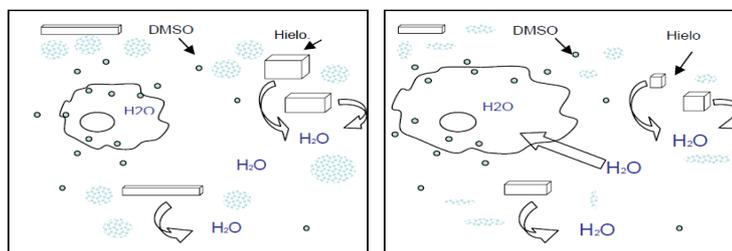


**Imagen 13.** Variaciones de volumen celular asociados a la extracción de DMSO a Temperatura ambiente.



### 2.7.5. Descongelación y retorno a las condiciones fisiológicas

Durante la descongelación se producen de forma inversa los cambios osmóticos descritos durante la congelación. Así, la célula vuelve a hidratarse para compensar la diferencia de concentraciones, más baja en el exterior celular, al pasar el agua de estado sólido a líquido (imagen 14).



I. Descongelación y disminución de la osmolaridad extracelular

II. Entrada de agua a la célula en respuesta a la descongelación.

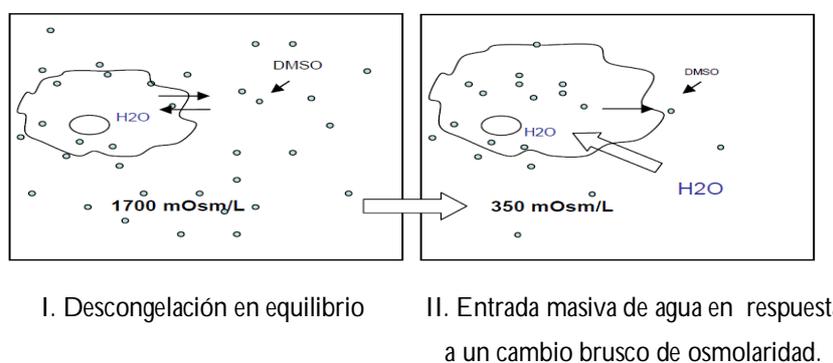
**Imagen 14.** Representación esquemática de la respuesta celular a la descongelación

La descongelación del producto hematopoyético criopreservado sería el último proceso antes de la infusión en el paciente. Este proceso se realiza mediante la inmersión del injerto hematopoyético en un baño a 37°C aplicando un suave masaje sobre la bolsa hasta que no queda hielo visible. La descongelación rápida (>100°C/min) evita la recrystalización del agua y consecuentemente el daño mecánico sobre las membranas celulares (184). Tras la descongelación, la exposición prolongada de las células criopreservadas a un ambiente hiperosmótico, sumado al retorno descontrolado a condiciones isotónicas, resulta en una

## INTRODUCCIÓN

entrada masiva de agua en la célula que puede ocasionar la ruptura de la membrana y la muerte celular (185). Cuando enfrentamos un producto hematopoyético descongelado a una solución isotónica, la gran concentración intracelular de DMSO provocará la entrada de agua del medio circundante a través de la membrana. Así la célula se expandirá para igualar la concentración del crioprotector a lado y lado de la membrana, a la vez que el DMSO difundirá hacia el exterior celular que presentará una concentración menor del crioprotector. Cuando las células descongeladas son infundidas inmediatamente tras la descongelación, el plasma del paciente será la solución circundante que tendrá una concentración de DMSO igual a cero (imagen 15).

El Dextrano 40 y las proteínas (moléculas que asocian agua a su estructura molecular) pueden ayudar al control del flujo de entrada de agua en las condiciones descritas (186). Para evitar el choque osmótico en el momento de la reinfusión de la suspensión celular descongelada (1700 mOsm/L) con su entrada en plasma (300mOsm/L), se ha propuesto un valor máximo de 500 mOsm/L para la suspensión celular descongelada antes de su entrada en plasma (141).



**Imagen 15.** Respuesta celular a un cambio brusco de osmolaridad

### 2.7.6. Lavado celular tras la descongelación

Para solucionar o limitar los posibles efectos secundarios relacionados con el DMSO, existen tres posibles soluciones:

- 1) Disminuir la cantidad de DMSO usada durante la criopreservación.
- 2) Reducir el volumen de la unidad.
- 3) Eliminar el DMSO previo a la reinfusión.

## INTRODUCCIÓN

- 1) Respecto a la **cantidad de DMSO** utilizada, aunque la concentración habitual es del 10%, hay algunos estudios publicados cuyo objetivo es analizar la viabilidad del uso de concentraciones de DMSO más bajas, incluso del 2% (187–190) o la mezcla de crioprotectores (191). Keung y Rowley describieron que por debajo del 5% de DMSO la recuperación celular se podría ver afectada, por lo que se recomienda su combinación con otros agentes crioprotectores como por ejemplo el hidroxietil almidón (6% HES+5% DMSO) (148,191).
- 2) La **reducción del volumen** de la unidad, ya sea por procedimientos automáticos o manuales, se ha utilizado principalmente con unidades procedentes de SCU, para optimizar el almacenamiento durante la criopreservación (192–195). Aunque también se ha utilizado con PH procedentes de aféresis (124). La reducción de volumen conlleva una disminución de la cantidad de solución criopreservante utilizada.

El estudio publicado en 2011 por Zinno et al. demuestra cómo el uso de métodos automáticos (Sepax® S100 system) para la reducción de volumen comparado con métodos manuales consigue una mayor reducción del volumen, además de permitir llevar a cabo todo el ciclo del proceso en un ambiente cerrado, con control de la contaminación, de acuerdo con las directrices GMP (good manufacturing practice) (196).

Sin embargo, estas técnicas resultan en una reducción limitada del crioprotector y no actúan sobre la presencia de restos celulares y moléculas resultantes de la lisis tras la descongelación.

- 3) **La eliminación de DMSO** es un procedimiento habitual en los trasplantes alogénicos de SCU. Se realiza mediante el lavado de las células de SCU criopreservadas. En los trasplantes autólogos este procedimiento se utiliza en casos seleccionados como, por ejemplo, pacientes pediátricos o pacientes con enfermedades cardiovasculares. Este procedimiento puede realizarse a través de métodos manuales y semiautomáticos (157,197–199) de acuerdo con la técnica de Rubinstein (4), o métodos automáticos (146,152,200–203). En los procedimientos realizados con métodos manuales o semiautomáticos, el sobrenadante que contiene el 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 obtenidos con estos procedimientos son

## INTRODUCCIÓN

variables y casi siempre resultan en una limitada eliminación del DMSO y escasa reducción de los restos celulares. Además, pueden acarrear una pérdida sustancial de progenitores comprometiendo el injerto.

La experiencia con los sistemas automáticos de lavado demuestra que son efectivos tanto desde el punto de vista de recuperación celular y colonias clonogénicas como de seguridad microbiológica; consiguiendo una eliminación del DMSO de hasta un 98%. Además el producto resultante muestra una osmolaridad similar a la del plasma, lo que evitaría un posible choque osmótico durante la infusión del producto descongelado.

Nuestro grupo publicó en el año 2012 un trabajo ratificando lo anterior, demostrando efectividad al utilizar un sistema automático de lavado para la eliminación del DMSO, en términos de recuperación de células CD34<sup>+</sup> y de viabilidad, con un descenso de efectos adversos relacionados con la infusión (11).

Por último, tanto el coste final, como el tiempo del procedimiento automático (20 min frente a 40 min) son menores que con los procesos manuales (204).

### **2.8. Acondicionamiento**

Es la quimioterapia y/o radioterapia administrada en los días previos a la infusión de los progenitores hematopoyéticos (54). Según su intensidad distinguimos (70):

- a) Acondicionamientos mieloablativos: altas dosis de quimioterapia y/o radioterapia, con el objeto de eliminar las células hematopoyéticas y tumorales del receptor, crear espacio medular e inmunodeprimir al paciente para reducir riesgo de fallo del injerto en caso de alotrasplante (70).
- b) Acondicionamientos no mieloablativos: constituido por fármacos inmunosupresores que facilitan el implante y la progresiva sustitución de la hematopoyesis del paciente por la del donante. El principal papel lo desarrolla el efecto del injerto contra la enfermedad o respuesta inmunológica antitumoral, que destruye a las células neoplásicas. En la tabla 7 se resumen los regímenes de acondicionamiento más utilizados.

## INTRODUCCIÓN

BASADOS EN IRRADICIÓN CORPORAL TOTAL (ICT)
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Ciclofosfamida+ ICT 10-12 Gy</li><li>▪ Etopósido + ICT</li><li>▪ Melfalán +ICT</li></ul>
BASADOS EN QUIMIOTERAPIA SOLA
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Busulfán+Ciclofosfamida</li><li>▪ Carmustina+etopósido+citarabina+melfalán (BEAM)</li><li>▪ Ciclofosfamida+etopósido+carmustina (CVB)</li><li>▪ Melfalán 200</li><li>▪ Busulfán+melfalán+thiotepa</li><li>▪ Ciclofosfamida+carboplatino+thiotepa (STAMP-V)</li><li>▪ Ciclofosfamida+globulina antitimocítica ( ATG)</li></ul>
ACONDICIONAMIENTOS DE INTENSIDAD REDUCIDA
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Fludarabina+ ciclofosfamida</li><li>▪ ICT 2 Gy ±fludarabina</li><li>▪ Fludarabina+busulfán ± ATG</li><li>▪ Fludarabina +melfalán ± alemtuzumab</li></ul>

**Tabla 7.**Regímenes de Acondicionamiento más utilizados (70).

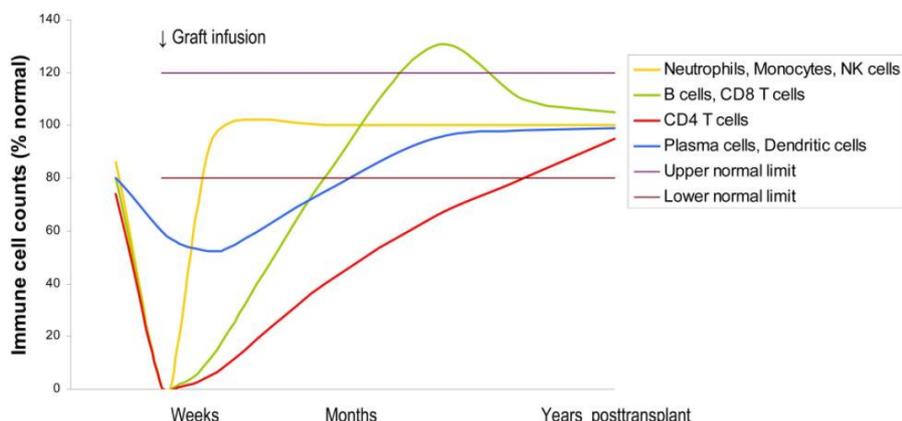
### 2.9. Tiempo de injerto

Durante la fase aplásica, se deben adoptar las precauciones necesarias para evitar en lo posible las complicaciones derivadas del tratamiento de acondicionamiento, sobre todo complicaciones infecciosas o hemorrágicas. Para ello se emplea antibioterapia, antifúngicos, fármacos antivirales y soporte transfusional con concentrados de hematíes y plaquetas. La recuperación hematológica suele iniciarse entre los días +10 y +14 (70).

## INTRODUCCIÓN

### 2.10. Reconstitución inmune

El tiempo necesario para alcanzar una reconstitución inmunológica completa después del TPH es muy variable y depende del tipo de trasplante, de la fuente de PH (SP, MO, SCU), del régimen de acondicionamiento, de la manipulación del inóculo mediante técnicas de eliminación de linfocitos T, del grado de histocompatibilidad entre donante y receptor, y de la presencia de EICH y de su tratamiento. Después del TPH existe una inmunodeficiencia que afecta tanto a la inmunidad celular como a la humoral (205). En las imágenes 16 y 17 se representan las fases de la recuperación celular y de las infecciones oportunistas en receptores de TPH respectivamente.



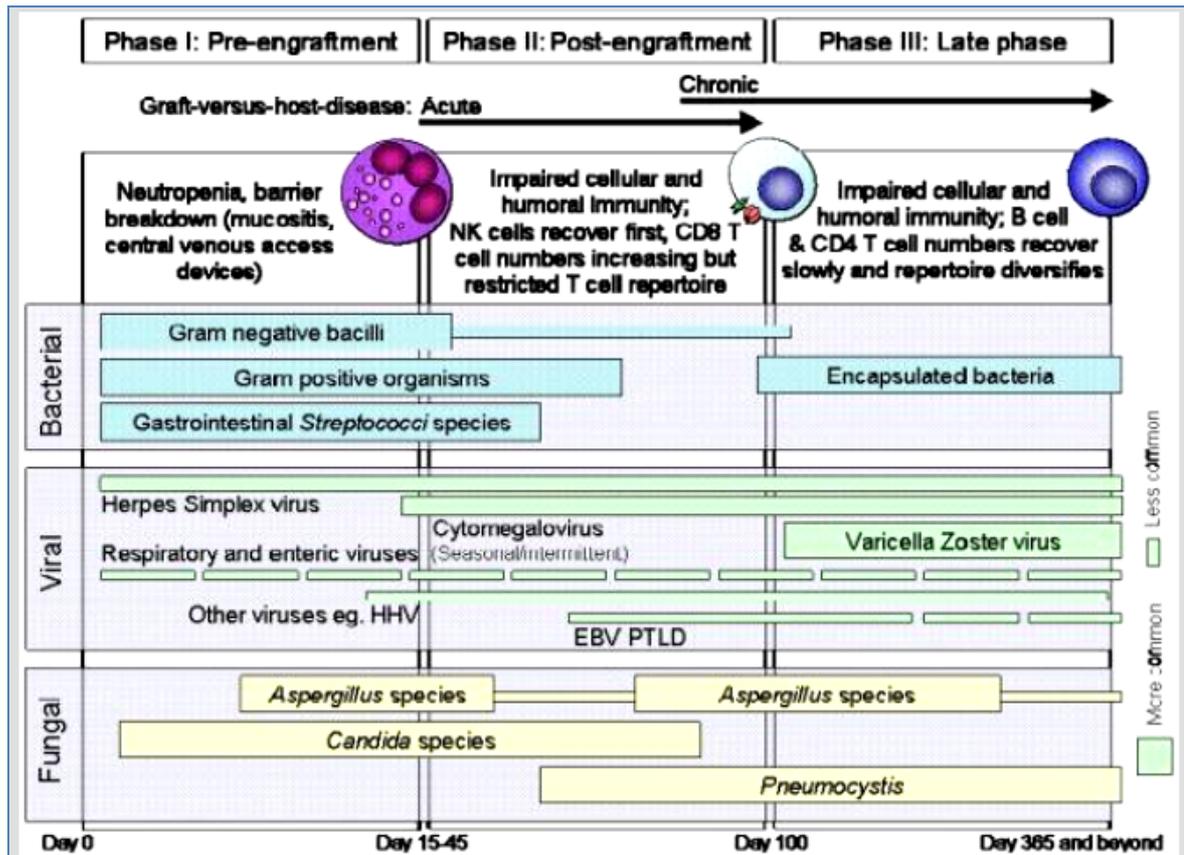
**Imagen 16.** Recuentos aproximados de células inmunes (expresado como porcentaje de los recuentos normales) peri y pos- TPH mieloablatoivo. Tomado de Tomblyn et al.(206)

La línea naranja representa las células innatas del sistema inmune (por ejemplo, neutrófilos, monocitos y células natural Killers [NK]), cuya recuperación está influenciada por el tipo de injerto (más rápido con los PHSP movilizados, intermedio con PH de médula ósea, y más lento con la SCU). La línea verde representa la recuperación de las células T CD8 + y células B, los recuentos de los cuales pueden llegar a ser transitoriamente supranormales. La recuperación de células B está influenciada por el tipo de injerto (siendo la más rápida después del trasplante de SCU) y se retrasa por EICH y / o su tratamiento. La línea azul representa la recuperación de células relativamente resistentes a radioterapia / quimioterapia, como las células plasmáticas y las células dendríticas (por ejemplo, células de Langerhans). La línea roja representa las células T CD4 +, cuya recuperación está influenciada principalmente

## INTRODUCCIÓN

por el contenido de las células T del injerto y la edad del paciente (más rápido en los niños que en los adultos).

Respecto a la inmunidad humoral, en las primeras 4 semanas postrasplante aumentan las IgE, siendo deficitarias en IgG<sub>2</sub> y en IgA durante al menos 6-18 meses (70).



**Imagen 17.** Fases de infecciones oportunistas en receptores de trasplante alogénico de PH.

Abreviaturas: EBV: virus de Epstein-Barr; HHV6: herpes virus humano 6; PTLD: enfermedad linfoproliferativa post-TPH. Tomado de Tomblyn et al.(206)

### 3. COMPUESTOS COLOIDALES EN MEDICINA TRANSFUSIONAL Y EN TERAPIA CELULAR.

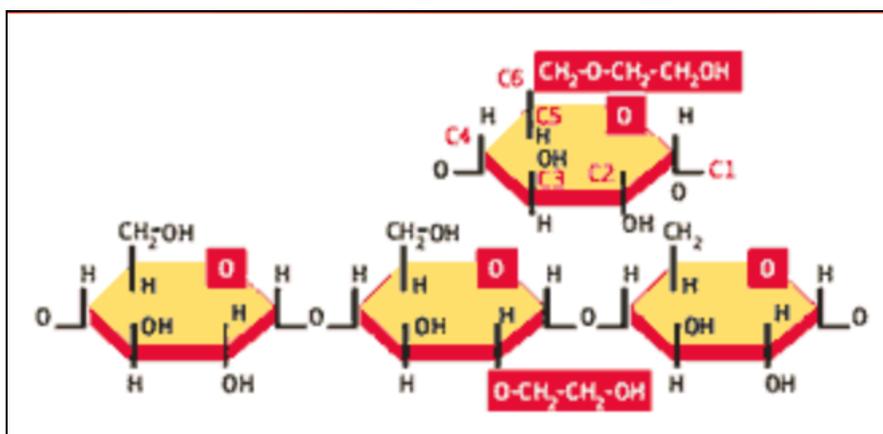
Durante mucho tiempo el producto de reemplazo más utilizado ha sido el plasma fresco congelado o sus equivalentes, con el consiguiente riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas. El desarrollo de técnicas de fraccionamiento y purificación de la albúmina humana llevó al uso terapéutico de este coloide como expansor de volumen, con

## INTRODUCCIÓN

excelente tolerancia inmunoalérgica. El desarrollo de coloides sintéticos capaces de provocar una expansión volémica tan efectiva y prolongada como la albúmina, permiten dar respuesta a la mayoría de las situaciones clínicas donde se necesita administrar volumen (207,208).

Los coloides pueden ser naturales (albúmina humana) y sintéticos (dextranos, gelatinas e hidroxietil almidones). El efecto de expansión volémica y duración de la acción de cada uno de ellos depende de las características de concentración, peso y estructura molecular, dispersión y cargas, presión osmótica coloidal, metabolismo y velocidad de eliminación, que establecen diferencias farmacológicas (209). A causa de su contenido de macromoléculas, los coloides permanecen dentro del espacio intravascular en una extensión mucho mayor que los cristaloides por la menor permeabilidad de la membrana endotelial a las partículas de la solución, lo que determina un efecto más rápido, efectivo y prolongado en el volumen intravascular y por consiguiente en la restauración de la volemia y la estabilización de las condiciones hemodinámicas del paciente (209–211).

**Hidroxietil almidón** (imagen 18): Son polisacáridos naturales modificados, extraídos del almidón de maíz. El compuesto principal es la amilopectina, un polímero de la glucosa de alto peso molecular. Se trata de moléculas de glucosa unidas por enlaces 1,4 glucosídicos (estructuras ramificadas, moléculas inestables de baja solubilidad y viscosidad elevada), que a través de la hidroxietilación, es decir, la sustitución de los grupos hidroxil por grupos hidroxietiléter en las moléculas de glucosa, logran retardar la hidrólisis, estabilizar la solución, disminuir la viscosidad y aumentar la solubilidad acuosa (212).

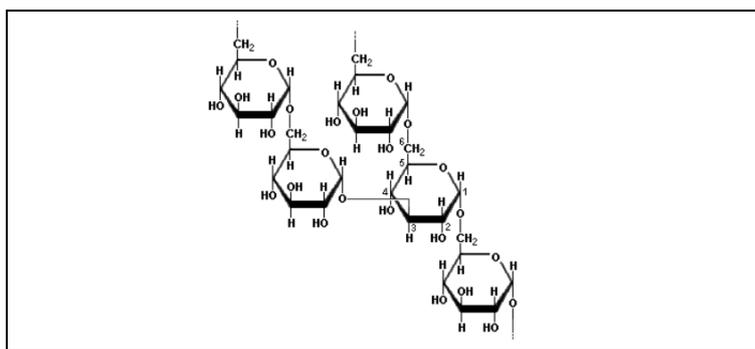


**Imagen 18.** Esquema molecular del Hidroxietil almidón (Tomado de [http://www.fresenius-kabi.com.ar/productos\\_voluven\\_caracteristicas.php](http://www.fresenius-kabi.com.ar/productos_voluven_caracteristicas.php) (213).

## INTRODUCCIÓN

**Dextranos** (imagen 19): Polisacáridos compuestos por residuos de alfa-D-glucosa, de peso molecular variable (según sean de 40, 60, 70, 75 y 110 x 10<sup>3</sup> Daltons de peso molecular medio) derivados de los dextranos producidos por la fermentación de la sacarosa mediante cepas de *Leuconostoc mesenteroides*. Se preparan por hidrólisis ácida controlada y fraccionamiento repetido con etanol. Las partículas de alto peso molecular aumentan la velocidad de sedimentación globular (VSG), lo que hizo que se la utilizara como sedimentador de los eritrocitos.

Los principales inconvenientes de los dextranos son su capacidad antigénica, por lo que pueden provocar reacciones anafilácticas severas de origen inmunológico, a veces debido a inmunización por dextranos nativos de la placa dental, de la crema dental y del azúcar común (214).



**Imagen 19.** Estructura de un fragmento de Dextrano (Tomado de <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos1.html> (215))

**Gelatinas:** Son compuestos obtenidos de la hidrólisis del colágeno bovino, lo que genera moléculas con pesos moleculares dentro de un amplio rango.

La administración de sustancias coloidales puede causar repercusión inmunoalérgica, renal y hemostática. La principal preocupación sobre los coloides es su capacidad antigénica y concretamente el riesgo de anafilaxia, que puede aparecer por lo general desde el inicio de la administración del sustituto, independientemente de la vía de administración. Las reacciones de hipersensibilidad son frecuentes pero, en general, menores como urticaria, erupciones, prurito, etc. El riesgo de anafilaxia con los hidroxietil almidones es 4,7 veces menor que con los dextranos, 6 veces menor que con las gelatinas e idéntico al de la albúmina. Los dextranos producen reacciones más graves que las gelatinas (214,216).

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de fallo renal agudo asociado con el uso de coloides fue descrito por primera vez con los dextranos y posteriormente con la administración de gelatinas, hidroxietil almidones al 10 % y soluciones de albúmina concentrada (20 %) (209). Existen 3 hipótesis para explicar los mecanismos de fallo renal agudo inducido por coloides (209):

1. Acumulación de fracciones de bajo peso molecular en los túbulos renales, que parecen ser específicas para las soluciones de dextrano.
2. Inducción de lesiones osmóticas similares a la nefrosis con vacuolización de las células tubulares proximales.
3. Fallo renal hiperoncótico. Parece la teoría patogénica más atractiva. Según ella, si se considera que el filtrado glomerular depende del balance entre la presión hidrostática (presión de perfusión renal) y las fuerzas oncóticas al nivel glomerular, en casos de baja presión de perfusión renal en las arterias glomerulares como consecuencia de la hipovolemia, un aumento de la presión coloidosmótica atribuible a la acumulación de sustancias no filtrables y osmóticamente activas en el plasma puede inducir una disminución del filtrado glomerular.

Además de los usos descritos como expansores del plasma, los coloides también se usan en el ámbito de la terapia celular como:

1. **Crioprotectores:** HES usado como complemento útil del DMSO en la criopreservación de PH (217,218).
2. **Sedimentadores eritrocitarios:** HES usado como sedimentador eritrocitario para reducir volumen en las unidades de sangre de cordón umbilical y optimizar así su almacenamiento en los tanques de Nitrógeno líquido (técnica manual descrita por Rubinstein et al. en el año 1995(4)). Es importante enfatizar que ya en el año 1969, el HES se utilizó de forma pionera como sedimentador de eritrocitos para mejorar la separación de un mayor número de granulocitos con el separador celular por centrifugación de flujo continuo NCI-IBM 2990, el primero utilizado para obtener leucocitos para transfusión (219).

## INTRODUCCIÓN

3. **Soluciones de lavado para la eliminación de DMSO** de los PH criopreservados tras su descongelación. El Dextrano 40 ha sido el componente principal de la solución utilizada para lavar o diluir los PH descongelados. En el año 1995 Rubinstein et al. describieron un método manual para la eliminación del DMSO contenido en los PH de SCU, realizando una dilución con una solución salina isotónica que contenía Albúmina humana y Dextrano 40, sometiéndola a centrifugación, eliminando el sobrenadante y re-suspendiendo las células sedimentadas en una solución de Albúmina fresca/Dextrano (4).

En el año 2003 Calmels et al. publicaron los resultados de un estudio pre-clínico, utilizando un sistema automático y cerrado de lavado (Cytomate<sup>®</sup>, actualmente retirado del mercado) para la eliminación de DMSO de los PHSP criopreservados utilizando una solución de lavado con tampón fosfato salino suplementada con Dextrano 40, ACD-A y Albúmina humana (200).

Las diferentes soluciones de lavado empleadas para la eliminación del DMSO consisten habitualmente en una solución salina o en un medio de cultivo celular junto a macromoléculas no permeables (dextrano, albúmina, anticoagulante ácido dextrato glucosa (A-ACD), aptas para su infusión y que proporcionan un ambiente discretamente hiperosmótico que ayuda a la extracción del DMSO contenido en el interior celular.

En la tabla 8 se muestran diferentes soluciones de lavado empleadas para la eliminación del DMSO.

## INTRODUCCIÓN

### Soluciones de lavado para la eliminación DMSO

- 10 % Dextrano-40 y 5% Albúmina humana en salino (173,198).
- PBS + 5% Dextrano-40+5% ACD-A +1% Albúmina humana (200).
- 10% ACD-A en salino (197,220).
- 7,5% Dextrano-40 + 5% Albúmina humana (202).
- 1/3 ACD-A + 2/3 Albúmina humana 4% (177).
- Solución salina con 10% ACD-A (152).
- 2,5%(w/v) Albúmina humana y 5% (w/v) Dextrano-40 en salino isotónico (4).
- 15% ACD-A en medio RPMI-1640 (162).
- 5% Dextrano-40 + 2,5% Albúmina humana + 10% ACD-A (203).

ACD=ácido citrato dextrosa; PBS=phosphate-buffered saline

**Tabla 8.** Soluciones de lavado para la eliminación del DMSO.  
Tomado y modificado de Z Shu. Bone Marrow Transplantation 2014 (183)

El HES fue validado en 2012, como solución de lavado para la eliminación de DMSO, por nuestro grupo en colaboración con otros grupos internacionales (12) y más recientemente por Reich-Slotky et al. en marzo 2015 (221).

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 1. HIPÓTESIS:

Nuestro grupo ha demostrado la eficacia y seguridad del lavado del DMSO y de los productos derivados de la lisis celular subsecuente al proceso de congelación y descongelación de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica tanto con solución salina suplementada con Albúmina (SSA) como con Hidroxietil almidón (Voluven®), utilizando un método cerrado y automatizado (Sepax).

Nuestra hipótesis es que la seguridad y la eficacia de dicho lavado no se ve afectada por el uso de cualquiera de las dos soluciones. La hipótesis alternativa sería, por tanto, que el lavado con alguna de las dos soluciones ofrece ventajas en seguridad o eficacia sobre la otra.

### 2. OBJETIVOS:

**2.1. Estudiar el efecto de la congelación/descongelación** sobre los progenitores hematopoyéticos.

**2.2. Comparar la eficacia y seguridad** del SSA y del Voluven® en el lavado de las bolsas de progenitores hematopoyéticos descongelados mediante un sistema automático y cerrado.

Los objetivos específicos serán:

- Analizar las características del producto celular en la bolsa de aféresis, al descongelarla y al lavarla.
- Analizar las características del injerto hematopoyético.
- Analizar la tasa de aislamientos microbiológicos en las bolsas de aféresis y tras el lavado.

**2.3. Comparar la seguridad en el paciente**, del SSA y del Voluven® en el lavado de progenitores hematopoyéticos descongelados mediante un sistema automático y cerrado.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los objetivos específicos serán:

- Estudiar la tasa de aislamientos microbiológicos en los pacientes y comprobar si existe relación con la contaminación microbiológica de las bolsas de aféresis.
- Estudiar el número de días de fiebre y días de hospitalización durante el procedimiento del trasplante.
- Estudiar las reacciones adversas durante la infusión de PHSP sometidos a ambos tipos de solución de lavado.
- Estudiar si en el grupo de pacientes lavados con Voluven<sup>®</sup> existe mayor riesgo de presentar insuficiencia renal grave.

## MATERIAL Y MÉTODOS

## MATERIAL Y MÉTODOS

## MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. Pacientes

Estudiamos a un total de 158 pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos (153 trasplantes autólogos y 5 trasplantes alogénicos) del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia (HCUVA) en el periodo comprendido entre septiembre de 2008 y julio de 2014. Los pacientes se distribuyen en dos subgrupos, según la solución de lavado empleada para la eliminación del dimetil sulfóxido, que son:

- Grupo lavado con SSA: solución de lavado compuesta por suero salino al 0.9% con ACD-A y albúmina humana al 20%.
- Grupo lavado con Voluven®: solución de lavado compuesta por una solución coloidal de Hidroxietil almidón al 6%.

El lavado con SSA se empleó desde septiembre del 2008 hasta febrero del 2012 y el lavado con Voluven® desde febrero del 2012 hasta julio 2014. En ambos grupos se utilizó para el lavado un sistema automatizado y cerrado para la eliminación de DMSO, mediante un procesador celular que consta de una cámara centrífuga para la separación de componentes sanguíneos según su densidad y tamaño (Sepax®).

Hemos analizado un total de 411 lavados, lo que corresponde a 211 procesos de aféresis, distribuidos de la siguiente manera (tabla 9):

**Tabla 9.** Distribución de la muestra por pacientes, por procesos de aféresis y por lavados.

Solución lavado	Nº pacientes	Nº procesos aféresis	Nº lavados
SSA	96	130	229
Voluven	62	81	182
TOTAL	158	211	411

Nota: El número de bolsas descongeladas (n= 437) fue mayor que el número de bolsas lavadas (n=411), debido a que un total de 49 bolsas se lavaron juntas.

Para todos los pacientes se obtuvieron los consentimientos informados correspondientes para cada uno de los procedimientos, según los requisitos del Comité de

## MATERIAL Y MÉTODOS

ética y ensayos clínicos del HCUVA. Se utilizaron los protocolos de la unidad de TPH, del grupo español de trasplante hematopoyético (GETH) y del grupo europeo de trasplante de médula ósea (EBMT) para valorar la indicación del trasplante. Previo al trasplante se realizó un estudio clínico completo que incluyó:

- Analítica completa: hemograma, bioquímica, coagulación, proteinograma, inmunoglobulinas, anormales y sedimento de orina, aclaramiento de creatinina, serologías de VHA, VHB, VHC, VIH, VHS, VEB, CMV y Toxoplasma.
- ECG
- Ecocardiograma
- Espirometría
- Test de difusión de CO
- Radiografía de tórax
- Tomografía computerizada (TC) cérvico- toraco y abdominopélvico y/o tomografía por emisión de positrones (PET)
- Gammagrafía ósea en el caso de tumores sólidos
- Serie metastásica en las gammopatías monoclonales
- Revisión estomatológica
- Aspirado con o sin biopsia de médula ósea.

## 2. Metodología del Trasplante

### 2.1. Movilización

Todos los pacientes recibieron un régimen homogéneo basado en una modificación del propuesto por Sheridan et al. (222). Se administró GCSF recombinante (Neupogen® Amgen Europe B.V., ZK Breda, Países Bajos. Granocyte® Italfarmaco, S.A., Madrid, España) a una dosis de 5 µg/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, de forma ambulatoria salvo concurrencia de otras causas de ingreso. En caso de presentar <10 células CD34<sup>+</sup> en el 4º día de movilización se dobló la dosis de G-CSF o se administró Plerixafor. En los casos en que no se alcanzó un número suficiente de PH para el trasplante se planificó una segunda movilización, que pudo ser similar a la primera o administrando quimioterapia previa al filgastrim.

### 2.2. Recolección de los progenitores hematopoyéticos

Las CPH de sangre periférica se recolectaron mediante procedimientos de aféresis. 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 leucoaféresis diaria hasta recolectar un número suficiente de PH para el trasplante (cantidad mínima  $2 \times 10^6$ /kg células CD34<sup>+</sup> medidas por citometría de flujo). En los pacientes con MM el objetivo fue conseguir  $4 \times 10^6$ /kg de células CD34<sup>+</sup> para un posible doble trasplante.

Las aféresis se realizaron en procesadores celulares de flujo continuo, empleando tres tipos de separadores celulares: Fenwal CS3000 Plus® (Baxter, Deerfield, IL, USA), Cobe® Spectra (Gambro BCT, Lakewood, CO, USA) y Optia (Terumo BCT, Lakewood, CO, USA). 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/mL de ACD-A.

La volemia del paciente se calculó mediante la siguiente fórmula (223)(imagen 20):

<b>Hombres</b>	<b>VS=0.3669A<sup>3</sup>+0.03219P+0.6041</b>
<b>Mujeres</b>	<b>VS=0.3561A<sup>3</sup>+0.03308P+0.6041</b>

**Imagen 20.** Fórmula volumen sanguíneo.

VS = volumen sanguíneo en litros A = altura en metros P = peso en kg.  
(Tomado de Nadler et al.: "Prediction of blood volume in normal human adults" Surgery 1962)

Inmediatamente antes del inicio de la aféresis se tomó una muestra de sangre periférica para el estudio hematimétrico y cuantificación de células CD34<sup>+</sup>: Durante los procedimientos de recolección de PHSP se tomaron muestras del paciente y del producto de aféresis para recuento, citometría de flujo y cultivos clonogénicos según el siguiente esquema:

- Al inicio se extrajo una muestra de sangre periférica anticoagulada con EDTA sin diluir (3 mL) para los recuentos de CT, CMN (monocitos más linfocitos) y determinación de células CD34<sup>+</sup> y otra muestra (10 ml) en un tubo con 0,2 cc de heparina sin conservantes para realizar una separación por gradiente de densidades con Ficoll (Lymphoprep) y obtener la fracción de células mononucleadas, con objeto de realizar los cultivos de colonias granulomonocíticas y eritroides.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- A mitad del procedimiento se recogió una muestra de 0,3 mL de la bolsa de recolección, para el recuento de células CD34<sup>+</sup> y así estimar la volemia que sería necesario procesar para obtener el número de CD34<sup>+</sup> deseado, y realizar el cultivo de colonias granulomonocíticas y eritroides.
- Al final del proceso se recogió una nueva muestra del producto final obtenido (0,5mL) para los recuentos de CT, CMN, células CD34<sup>+</sup>, viabilidad y cultivos de colonias granulomonocíticas y eritroides de los progenitores hematopoyéticos. Se cursaron muestras para cultivos microbiológicos. Se extrajo también una muestra de sangre periférica en tubo con EDTA para controlar el hemograma final del paciente y comprobar el nº de células CD34<sup>+</sup> circulantes en sangre periférica tras la aféresis.

### 2.3. Criopreservación celular

El producto de la aféresis se mezcló con una solución crioprotectora compuesta por DMSO y plasma autólogo o heterólogo isogrupo en el caso de pacientes con peso inferior a 20 Kg, para tener una concentración celular (leucocitaria) final máxima de  $150 \times 10^6/\text{ml}$  y una concentración final de DMSO del 9%. Todo el proceso se realizó en condiciones estériles, manteniendo las bolsas refrigeradas sobre bloques acumuladores de hielo para evitar la toxicidad del DMSO sobre las células. La solución crioprotectora se añadió lentamente y en agitación suave.

El producto final se repartió en un mínimo de dos bolsas de criopreservación (Cryocyte<sup>®</sup>, Baxter Healthcare Corporation, Immunotherapy Division, Deerfield, IL., USA) sin exceder un volumen final por bolsa de 150 mL. Inmediatamente se sometieron a criopreservación programada mediante un congelador biológico programable (CM-2000, Carbueros Metálicos, Barcelona, España) (imagen 21) para obtener una máxima viabilidad tras el proceso de congelación. 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. Tras alcanzar la T<sup>a</sup> de -120°C, el producto congelado fue almacenado en tanques de nitrógeno líquido a -196°C (imagen 22).

## MATERIAL Y MÉTODOS



**Imagen 21** Congelador biológico programable



**Imagen 22:** Tanque de nitrógeno líquido

Se realizaron controles de calidad antes de la mezcla con plasma y DMSO (contaje celular, determinación de CD34<sup>+</sup>, y cultivos de colonias) y tras la adición de la mezcla criopreservadora (viabilidad y control microbiológico).

### 2.4. Acondicionamiento

Los regímenes de acondicionamiento empleados por patologías en nuestro grupo de pacientes se detallan a continuación:

#### ❖ Acondicionamientos administrados en los casos de Trasplante Autólogo

- Mieloma múltiple

**Mel 200:** Melfalán 100 mg/m<sup>2</sup>/d iv, los días -2 y -1. (Dosis total: 200 mg/m<sup>2</sup>)(224,225).

**Mel 140:** Melfalán 140 mg/m<sup>2</sup>/d iv el día -2. (226).

**Mel 70:** Melfalán 70 mg/m<sup>2</sup>/d el día -2. (227)

**Bumel:** Busulfan 3,2 mg/Kg/d iv, los días -5 a -3 (Dosis total: 9,6 mg/kg)  
Melfalán 140 mg/m<sup>2</sup> el día -1 (228,229)

- Linfomas agresivos/ Linfomas indolentes / Linfomas de Hodgkin

**BEAM:** Carmustina o BCNU 300 mg/m<sup>2</sup>/d iv el día -6.  
Etopósido 200 mg/m<sup>2</sup>/d, los días -5 a -2. (Dt: 800 mg/m<sup>2</sup>)  
Citarabina 200 mg/m<sup>2</sup>/12 h, los días -5 a -2 (Dt: 1600 mg/m<sup>2</sup>)  
Melfalán 140 mg/m<sup>2</sup> el día -1 (230,231)

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Leucemias agudas mieloides / Leucemias agudas linfoides

**BUCY:** Busulfan 3,2 mg/kg iv/d los días -7 a -4 (Dosis total: 12,8 mg/Kg)  
Ciclofosfamida 60 mg/Kg iv c/ d, los días -3 a -2 (Dosis total 120 mg/Kg) (232,233)

**BEA:** Busulfán iv 3,2 mg/Kg los días -8 a-5 (Dosis total: 12,8 mg/kg)  
Etopósido 20 mg/Kg/día, los días -4 a-3 (Dosis total: 40 mg/Kg)  
ARA-C 3000 mg/m<sup>2</sup>/12 h en 500 mL de G5% en 3 horas los días-3 a-2 (Dosis total: 12.000 mg/m<sup>2</sup>) (234)

- Linfomas de Hodgkin/Linfomas Agresivos

**Cy-ICT:** Ciclofosfamida 60 mg/kg iv en 1 hora los días -6 a-5 (Dosis total: 120 mg/kg)  
Irradiación corporal total 2 Gy/día los días -6 a -1 (Dosis total:12 Gy) (235)

- Linfoma cerebral primario

**Tiotepa-BCNU:** Tiotepa 5 mg/kg, los días -5 a -4 (Dosis total: 10 mg/Kg)  
Carmustina o BCNU 400 mg/m<sup>2</sup> el día -6.(236)

- Esclerosis múltiple

**Cy200-ATG:** Ciclofosfamida 50 mg/kg/día, los días -5 a -2 (Dosis total: 200 mg/Kg)  
Globulina antitimocítica de conejo 1,5 mg/kg/día, los días -5 a -2 (Dosis total: 6 mg/Kg) (237).

- Tumores embrionarios

**TT-CARBO:** Tiotepa 200 mg/m<sup>2</sup>, los día -6 a -4 (Dosis total: 600 mg/m<sup>2</sup>)  
Carboplatino 400 mg/m<sup>2</sup>, los días -6 a -4 (Dosis total: 1200 mg/m<sup>2</sup>) (238)

**PEI:** Cisplatino 20 mg/m<sup>2</sup>/ día -6 a -2 (Dosis total: 100 mg/m<sup>2</sup>)  
Etoposido 300 mg/m<sup>2</sup>/ de -6 a-2 (Dosis total: 1500 mg/m<sup>2</sup>)  
Ifosfamida 2000 mg/m<sup>2</sup>/día de -6 a -2 (Dosis total: 10.000 mg/m<sup>2</sup>)

- Tumores sólidos

**BuMel:** Busulfán iv 3,2 mg/kg iv, en salino a pasar en 3 horas los días -6 a -3 (Dosis total: 12,8 mg/Kg)  
Melfalán 140 mg/m<sup>2</sup> en 250 de salino en 30 min el día -1 (239).

**CARBO-VP-16-MELped:** Carboplatino AUC 4 mg min/mL/día, los días -7 a -3 (Dosis total: 20 mg min/mL)  
Etoposido 200 mg/m<sup>2</sup>/día, los días -7 a -3. (Dosis total: 1000 mg/m<sup>2</sup>)  
Melfalán 180 mg/m<sup>2</sup>/día, iv el día -2 (240)

**VP-16-CARBO-CY:** Carboplatino 400 mg/m<sup>2</sup>/día los días -6 a -3 (Dosis total: 1600 mg/m<sup>2</sup>)  
Ciclofosfamida 1600 mg/m<sup>2</sup>/día los días -6 a -3 (Dosis total: 6400 mg/m<sup>2</sup>)  
Etopósido 450 mg/m<sup>2</sup>/día los días -6 a -3 (Dosis total: 1800 mg/m<sup>2</sup>) (241)

**VP-16-CARBO-Ifosfamida:** Carboplatino 300 mg/m<sup>2</sup>/día los días -6 a -2 (Dosis total: 1500 mg/m<sup>2</sup>)  
Ifosfamida 2000 mg/m<sup>2</sup>/día los días -6 a -2 (Dosis total: 10000 mg/m<sup>2</sup>)  
Etopósido 300 mg/m<sup>2</sup>/día los días -6 a -2 (Dosis total: 1500 mg/m<sup>2</sup>) (242)

## MATERIAL Y MÉTODOS

### ❖ Acondicionamientos administrados en los casos de Trasplante Alogénico

- Anemia de Fanconi

**FLUCY-ATG:** Fludarabina 30 mg/m<sup>2</sup>/día, los días -5 a-2. (Dosis total: 120 mg/m<sup>2</sup>)  
Ciclofosfamida 50 mg/kg/día los días -5 a-2 (Dosis total: 200 mg/kg)  
ATG conejo 2,5 mg/kg/día los días -3 a-1 (Dosis total: 7,5 mg/kg) (243)

- Leucemia mielomonocítica juvenil

**FLUBU-TT:** Metilprednisolona 5 mg/kg/d, los días -6 a-2. (Dosis total: 25 mg/kg)  
Fludarabina 25 mg/m<sup>2</sup>/día los días-6 a-2 (Dosis total: 125 mg/m<sup>2</sup>)  
Busulfán 3,2 mg/kg/día los días-6 a-5 (Dosis total: 6,4 mg/kg)  
Tiotepa 5 mg/kg/día los días-3 a-2. (Dosis total: 10 mg/kg)

- Linfomas no Hodgkin-T cutáneo

**FLUMEL-CAMPATH:** Fludarabina 30mg/m<sup>2</sup>/día, los días -7 a -3 (Dosis total: 150 mg/m<sup>2</sup>)  
Alemtuzumab 10mg/día, los días -7 a -3 (Dosis total: 50 mg)  
Melfalan 140 mg/m<sup>2</sup>/día, el día -2 (244)

- Sarcoma de Ewing

**FLU-ATG-ICT:** Fludarabina 40 mg/m<sup>2</sup>, los días -4 a -2 (Dosis total: 120 mg/m<sup>2</sup>)  
ATG conejo 3 mg/kg, el día -1  
ICT 2 Gy el día 0

- Leucemia mielomonocítica crónica en fase acelerada

**Cy-ICT:** Ciclofosfamida 60 mg/kg iv en 1 hora los días -6 a-5 (Dosis total: 120 mg/kg)  
Irradiación corporal total 2 Gy/día los días -6 a -1 (Dosis total:12 Gy) (235)

- Leucemia aguda de línea ambigua

**FLUBU-ATG:** Fludarabina 40 mg/m<sup>2</sup>/d, los día -6 a -3 (Dosis total: 160 mg/m<sup>2</sup>)  
Busulfan 3,2 mg/Kg/d, los días -6 a -3 (Dosis total: 12,8 mg/kg)  
ATG 2 mg/Kg/d, los días -3 a-1 (Dosis total: 6 mg/kg)

Nota: En el caso de pacientes pediátricos, la dosis de Busulfán intravenoso, se calculó según el peso del paciente (tabla 10).

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

**Tabla 10.** Dosis de Busulfán iv según peso

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.5. Descongelación y lavado

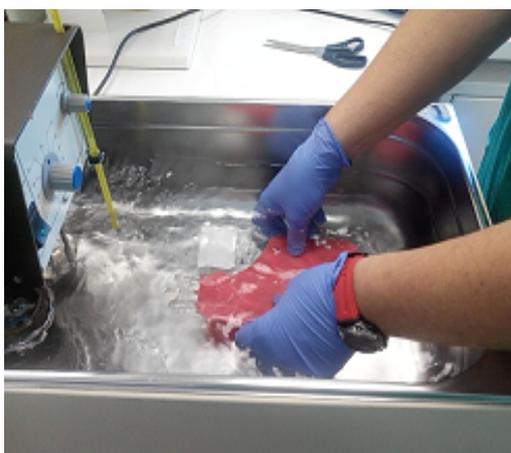
El día del trasplante (día 0) el material criopreservado se descongeló mediante la inmersión en un baño a 37°C (imagen 23), en tandas de 220 ml (el máximo que puede procesar el Sepax® en cada ciclo) y se procedió a su lavado mediante un sistema automatizado y cerrado con el procesador Sepax® (Biosafe S.A., Rte du Petit-Eysins, Eysins, Switzerland) (imagen 24), para la depleción del DMSO y su posterior infusión.

La solución de lavado empleada fue distinta en cada uno de los grupos a estudio:

- Albúmina humana al 20% / Suero Fisiológico/ ACD-A (SSA) ó,
- Voluven®

Tras finalizar el proceso de lavado se sellaron y se separaron la bolsa de recogida y de desecho. De la bolsa lavada se tomó una muestra de 0,5 ml y se hizo una dilución al 1/10 con voluven® (o con PBS en el grupo lavado con SSA) para los recuentos celulares, citometría, cultivos de colonias y viabilidad. Para finalizar se midió el volumen de la bolsa con jeringas de 50 mL y del remanente de la bolsa se extrajo 1 ml aproximadamente para los cultivos microbiológicos.

Tras el lavado y hasta la infusión hubo un intervalo medio de tiempo de aproximadamente 30 minutos.



**Imagen 23.** Descongelado en baño a 37°C



**Imagen 24.** Lavado de PH con Sepax®

### 2.6. Infusión de progenitores hematopoyéticos

Tras finalizar la quimioterapia de acondicionamiento y dejando un margen mínimo de seguridad de 24 horas se procedió a la infusión del producto celular descongelado y lavado, a través de una vía venosa central y utilizando un filtro de agregados de 170 micras (imagen 25). Previamente a la infusión se administró una premedicación con actocortina 100 mg iv, paracetamol 1 g iv y dexclorfeniramina 5 mg iv. Durante todo el proceso se controlaron las constantes y la presión venosa central.



**Imagen 25.** Momento de la infusión de PH lavados

### 2.7. Manejo clínico y medidas de soporte postrasplante

Los pacientes fueron ingresados en régimen de aislamiento inverso y con filtros HEPA mientras el recuento de neutrófilos permaneció por debajo de  $0,5 \times 10^9/L$ . Los episodios infecciosos se manejaron según protocolos estándar, utilizando antiviricos y antifúngicos azólicos por vía intravenosa de forma profiláctica (desde el inicio del acondicionamiento) más meropenem anticipado (desde el día -1). Se realizaron controles analíticos con periodicidad diaria (hemograma, creatinina, ionograma, urea) o dos/tres veces por semana (bioquímica general, coagulación, etc.). En el día +5 post-infusión de PHSP se administró G-CSF diariamente hasta superar la cifra de 500 neutrófilos/mcL durante tres días consecutivos.

La transfusión de hematíes se indicó cuando los recuentos de hemoglobina estaban por debajo de 8 gr/dL, infundiéndose dos unidades de concentrados de hematíes cada vez o 10 mL/kg en pacientes pediátricos con peso inferior a 40 kg.

## MATERIAL Y MÉTODOS

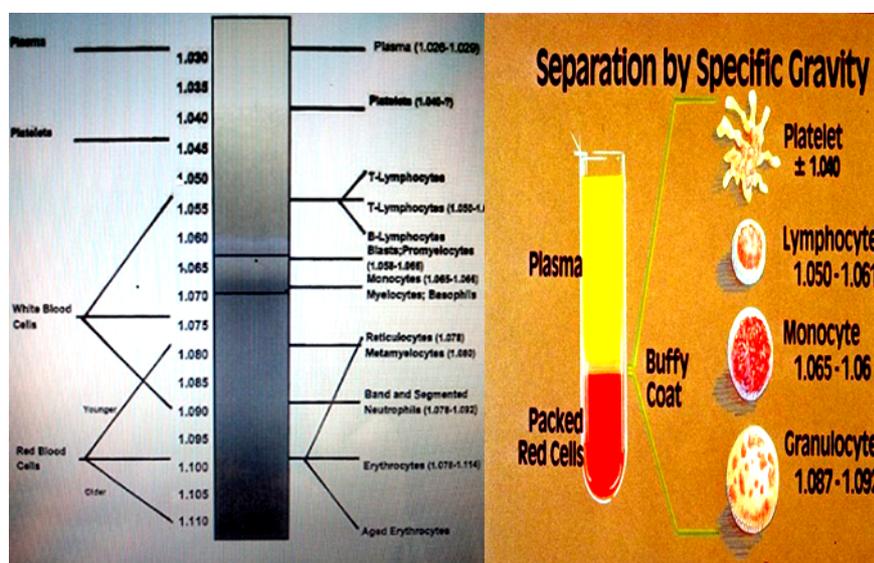
La transfusión de plaquetas de forma profiláctica se realizó cuando los valores hemoperiféricos fueron inferiores a  $10\text{-}15 \times 10^9$  plaquetas/L. La mayoría de las unidades transfundidas procedían de plaquetoféresis de donante único. En su ausencia se administraron dosis de 1 pool de plaquetas (5 unidades de plaquetas "random" procedentes de donaciones de sangre total).

### 3. Aparatos y soluciones de lavado

#### 3.1. Procesadores celulares

Para entender el funcionamiento de los procesadores celulares hay que conocer el efecto de la centrifugación sobre la sangre periférica.

La centrifugación tiene como base el uso de las fuerzas gravitatorias para separar del plasma sus diferentes componentes. De acuerdo al grado de densidad (gravedad específica, SG), los componentes de la sangre son estratificados dentro del plasma (SG 1025 a 1029), plaquetas (1040), linfocitos (1070), granulocitos (1087 a 1092), y hematíes (1093 a 1096) (imagen 26).



**Imagen 26.** Esquema de las diferentes densidades de los elementos sanguíneos

A principios de la década de 1950 se desarrollaron los primeros trabajos con centrifugación con flujo continuo para la separación de los componentes sanguíneos, en los

## MATERIAL Y MÉTODOS

laboratorios de Edwin J. Cohn, PhD at Harvard Medical School. Y desde entonces hasta la actualidad se han desarrollado múltiples dispositivos de plasmaseparadores (245–248).

Durante el periodo de tiempo que abarca nuestro estudio se utilizaron tres procesadores celulares de flujo continuo, el Fenwall CS-3000 plus<sup>®</sup> (Baxter, Deerfield, IL, USA), el Cobe<sup>®</sup> Spectra (Gambro BCT, Lakewood, CO, USA) y el Optia<sup>®</sup> Spectra (Terumo BCT, Lakewood, CO, USA). El procesador Cobe<sup>®</sup> Spectra fue el más utilizado durante el periodo que abarca nuestro estudio.

### Procesador Fenwall CS-3000 plus<sup>®</sup>:

Se utilizó con flujo de entrada entre 30-40 mL/min en pacientes pediátricos y 60-80 mL/min en adultos (imagen 27). Este aparato realiza una separación en dos fases. La sangre pasa a través de unas bolsas encajadas en unas cámaras rígidas, cámara de separación y cámara de recolección, y dentro de ellas se somete a la fuerza centrífuga. La primera cámara o cámara de separación, separa los hematíes y granulocitos de los restantes componentes sanguíneos y son devueltos al paciente directamente. La última fracción, denominada plasma rico en componentes, es bombeada hacia la segunda cámara o cámara de recolección, donde, tras la centrifugación del producto y gracias al relieve interno de la cámara, la parte más densa del plasma rico en componentes, es decir las CMN, quedan retenidas en la bolsa, y el plasma junto con la mayor parte de las plaquetas salen para ser devueltos al paciente (249).

### El procesador Cobe<sup>®</sup> Spectra:

Se utilizó con flujo de entrada entre 1-1.5 mL/min/kg en pacientes pediátricos y un máximo de 120 mL/min en adultos, según fuera el comportamiento del acceso venoso y manteniendo una tasa de infusión de anticoagulante <1.1 ml/min/kg. Se empleó la versión 5.1 de software con el programa convencional de recolección de CMN y una proporción de anticoagulante entre 1:24 (imagen 27).

La máquina introduce la sangre recogida en un extremo de un cinturón colocado en una centrífuga. En el otro extremo del cinturón se encuentran tres puertos que recogen respectivamente los eritrocitos, el plasma y las células mononucleadas, una vez separadas por gradiente de densidad gracias a la fuerza de centrifugación. Los eritrocitos y el plasma se unen en una cámara y son devueltos al paciente, mientras que las CMN son almacenadas en

## MATERIAL Y MÉTODOS

una bolsa separada. El control del producto obtenido en el puerto de CMN se realiza de modo visual, ajustando su color en la línea de recogida a un hematocrito de 2-3%. Este ajuste se realiza controlando la velocidad de la bomba de extracción de plasma.

### El procesador Optia® Spectra:

El sistema Spectra Optia es una evolución del Cobe Spectra, diferenciándose esencialmente en que dispone de un sistema óptico automático para detectar la interfase, que realiza el seguimiento, interpretación y ajuste en la interfase de CMN en tiempo real. Esta modificación del sistema elimina la necesidad del ajuste manual de la bomba de plasma, reduce el potencial de errores y el tiempo de capacitación de los operadores (imagen 27).



**Imagen 27.** Procesadores celulares utilizados. De derecha a izquierda: Fenwall CS-3000plus®, Cobe®Spectra y Optia® Spectra

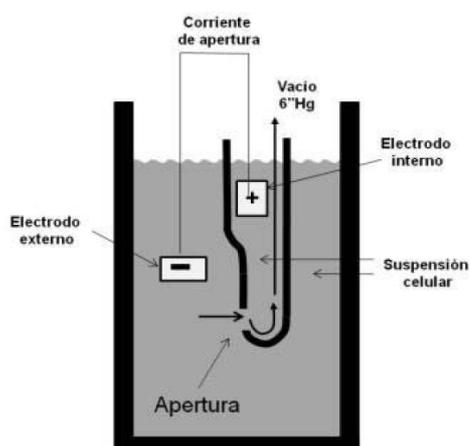
### **3.2. Contadores celulares automáticos**

Hasta el año 2012 se trabajó con el contador Sysmex® KX-21N (Roche Diagnostics S.L., San Cugat del Valles, Barcelona, España) y a partir de entonces se utilizó el contador Cell-Dyn Sapphire (Abbott laboratorios, Illinois, USA).

Los principios básicos que se utilizan para el funcionamiento de los analizadores hemáticos son fundamentalmente dos: la **impedancia electrónica** (o resistencia a la

## MATERIAL Y MÉTODOS

corriente continua (CC)) y la **dispersión óptica**; siendo la impedancia electrónica la metodología más utilizada. La impedancia eléctrica (250), también conocida como principio de Coulter, en honor al ingeniero Wallace Henry Coulter quien lo descubrió en 1956 (251), se basa en la resistencia que presentan las células, que no son conductoras eléctricas, al paso de la corriente eléctrica cuando atraviesan un pequeño orificio, llamado "orificio de apertura", que separa dos medios con diferente potencial (imagen 28). Cada vez que una célula atraviesa el orificio de apertura se presenta un cambio en la resistencia eléctrica que el instrumento interpreta como un impulso que es proporcional al volumen de líquido desplazado. Así, los impulsos representan el tamaño celular y el número de células que atraviesan el orificio de apertura es proporcional a su concentración en el medio electrolítico. Los datos se trazan en un gráfico de distribución de frecuencia, o histograma de distribución de tamaño, con el número relativo en el eje Y y el tamaño en el eje X.



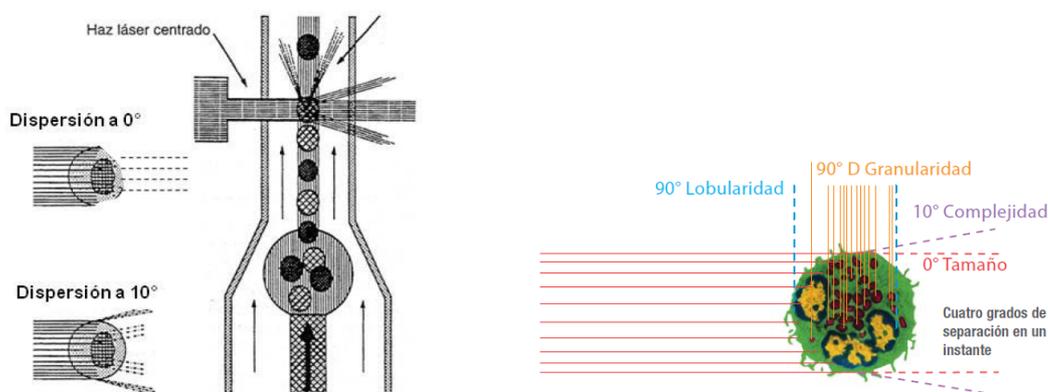
**Imagen 28:** Principio de Coulter para el recuento celular

La dispersión óptica puede utilizarse como la metodología primaria o en combinación con otros métodos. En los sistemas de dispersión óptica (citómetros de flujo) una masa de la muestra (centrada de forma hidrodinámica) se dirige por un canal de cuarzo que genera un "flujo celular", sobre el que impacta una fuente de luz centrada, que puede ser de luz halógena, de tungsteno, o láser de helio y neón. La luz dispersa se mide en varios ángulos. Los sistemas Cell-Dyn generan citogramas o trazados de dispersión bidimensional, la llamada tecnología M.A.P.S.S de Abbott, donde la dispersión frontal de la luz de  $0^\circ$  se utiliza para determinar el tamaño celular, la dispersión ortogonal de  $90^\circ$  para determinar la lobularidad nuclear, la dispersión de la luz en ángulo estrecho de  $10^\circ$  se correlaciona con la complejidad

## MATERIAL Y MÉTODOS

celular, y la dispersión de la luz despolarizada de 90 (90°D) para evaluar la granularidad celular (imagen 29).

- **El contador Cell-Dyn** (imagen 31) tiene tres canales de medición independientes para determinar el hemograma y el recuento diferencial: 1) un canal óptico para el recuento leucocitario y datos diferenciales, que utiliza la separación por dispersión polarizada con múltiples ángulos (M.A.P.S.S) patentado por CELL-DYN; 2) un canal de impedancia para los datos de los eritrocitos y plaquetas, y 3) un canal de hemoglobina.



**Imagen 29.** Tecnología M.A.P.S.S. de Abbott

- **El contador Sysmex® KX-21N** (imagen 30) para determinar el hemograma utiliza tres subsistemas hidráulicos: el canal para leucocitos, el canal para eritrocitos y un canal separado para hemoglobina. En las cámaras del transductor los leucocitos y eritrocitos, las muestras diluidas se aspiran a través de aperturas diferentes y se cuentan por medio del método de impedancia (detección de CC).



**Imagen 30.** Sysmex® KX-21N.



**Imagen 31.** Contador Cell-Dyn Sapphire

### 3.3. Citómetro de flujo BD FACS Canto II® (imagen 32)



**Imagen 32.** Citómetro de flujo BD FACS Canto II® (Becton-Dickinson, San José, CA., USA)

La CMF permite obtener información simultánea sobre un gran número de parámetros de cada una de las células que se analizan con gran rapidez, objetividad y sensibilidad. No proporciona información sobre la localización y distribución dentro de la célula del parámetro analizado, sino un valor medio para cada célula en particular. Esto permite identificar en una muestra subpoblaciones celulares diferentes, incluso las minoritarias (252,253).

El principio en el que se basa es simple: las células o partículas biológicas a analizar se marcan con anticuerpos unidos a fluorocromos, se suspenden en un flujo de líquido isotónico y son empujadas a pasar, alineadas de una en una y a gran velocidad, por delante de un haz luminoso. Del impacto del rayo de luz sobre cada célula, se obtiene información sobre la dispersión de la luz y la excitación de los fluorocromos. Esta información se recoge por detectores que convierten las señales captadas en señales electrónicas que finalmente son digitalizadas y procesadas desde el punto de vista informático.

Así, la información obtenida puede agruparse en dos grupos de parámetros:

1. Señales de dispersión: la luz al incidir sobre la célula es dispersada ("light scatter"). Las características morfológicas que determinan la dispersión de la luz son fundamentalmente el tamaño celular (FSC o "Forward Scatter") y la granularidad interna de la célula, llamada complejidad (SSC o "Side Scatter") (111).

## MATERIAL Y MÉTODOS

2. Señales de fluorescencia: son las que se asocian con la luz emitida como consecuencia de la presencia en la célula de fluorocromos tras ser excitados por el rayo luminoso, bien sea de forma natural (autofluorescencia) o unidos a ella artificialmente. La detección o no de la luz emitida por el fluorocromo unido a un anticuerpo específico nos informa indirectamente de la presencia o ausencia de la molécula contra la cual va dirigida el anticuerpo en la célula.

Los citómetros de flujo permiten detectar señales de fluorescencia procedentes de complejos anticuerpo-fluorocromo situados en una célula, siendo la cantidad de fluorescencia emitida proporcional al número de moléculas presentes en la célula (111).

❖ Parámetros del citómetro de flujo:

**a. Sensibilidad:** es el número de marcadores detectables para la fluorescencia. Depende de muchos factores como el tiempo que transcurre, el solapamiento entre las longitudes de onda de excitación y el espectro de absorción del fluorocromo (254).

**b. Especificidad:** se debe considerar que los citómetros ofrecen una información relativa, no absoluta. Para cuantificar hay que correlacionar los canales con resultados de muestras conocidas, es decir, calibrar y ajustar las escalas. Para ello se utilizan estándares de alineación, que son materiales estables que tienen unos valores determinados de fluorescencia o dispersión de la luz, válidos para detectar cambios y problemas en la configuración óptica y señal con el tiempo. Estos estándares se basan en el cálculo del ratio entre los dobletes/singletes analizados de un marcaje control. Actualmente se ofrece una linealidad entre 1.95 y 2.05 para cada láser (254).

**c. Resolución:** se define como la partícula más pequeña detectable que es un valor cercano a  $1 \mu\text{m}$  ( $10^{-6}\text{m}$ ). En el caso de la fluorescencia, la resolución se mide como coeficiente de variación, es decir, la desviación estándar relativa de la media de la señal producida por las células o partículas analizadas. En este caso, la resolución dependerá de la estabilidad de la fuente de luz, del flujo de la muestra, de su anchura, de la intensidad de la señal y la luminiscencia de fondo o ruido. Actualmente los citómetros tienen una resolución menor al 3% (254).

**d. Velocidad media:** los citómetros han evolucionado mucho en este aspecto, así se han llegado a conseguir velocidades de análisis realmente elevadas. La velocidad normal de

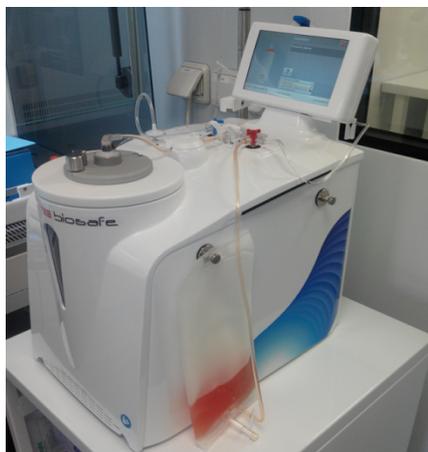
medida es de 5000 células por segundo dependiendo de los parámetros que se quieran analizar.

**e. Número de parámetros medibles por muestra:** la mayoría de los citómetros de flujo vienen preparados con uno o dos láseres y con cuatro lentes, lo que nos permite analizar hasta seis parámetros a la vez (254).

### **3.4. Sistema automático de lavado de DMSO en progenitores hematopoyéticos descongelaos: SEPAX<sup>®</sup> (imagen 33)**

El dispositivo Sepax<sup>®</sup> es un procesador celular que consta de una cámara centrífuga para la separación de componentes sanguíneos según su densidad. 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<sup>®</sup> 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.

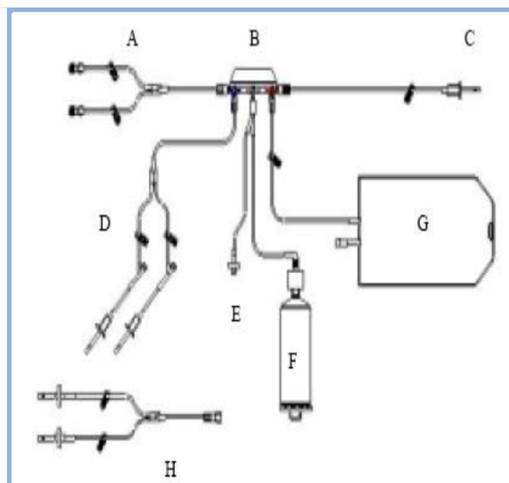
La cámara neumática produce una presión negativa (retirada del émbolo) que permite el paso de la suspensión celular de su bolsa inicial al interior de la cámara donde da comienzo la centrifugación que separará los componentes de la sangre y permite al finalizar el proceso, mediante la aplicación de una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



**Imagen 33.** Dispositivo Sepax<sup>®</sup>

## MATERIAL Y MÉTODOS

El equipo desechable (Kit CS-600.1 para el Sepax®) (imagen 34), consiste en un equipo de tubos apirogénicos, estéril y de un solo uso al que se conecta la solución de lavado y el producto inicial. La bolsa de residuos viene incorporada en el equipo así como la cámara centrífuga/neumática.



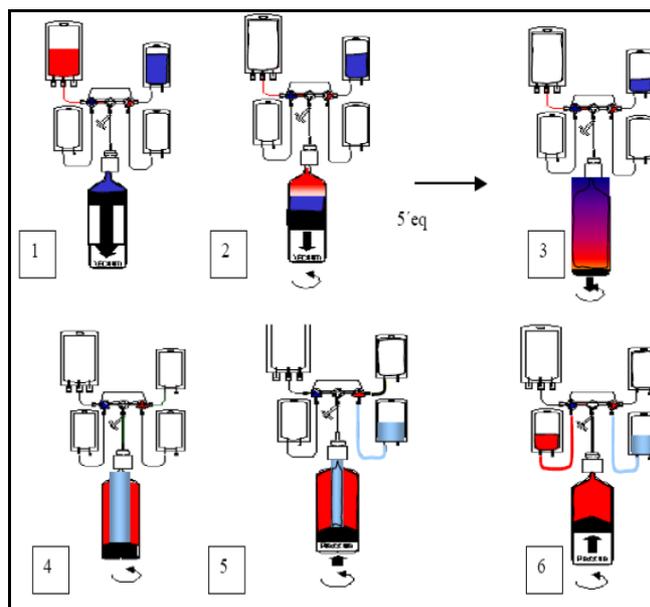
A: Doble línea de entrada. Conexión bolsa inicial. B: Distribuidor de llaves de paso. C: Entrada de la solución de lavado. D: Doble línea de salida. Conexión bolsa final. E: Transductor de presión. F: Cámara de separación. 220 mL. G: Bolsa de desecho. 1000 mL. H: Adaptador de conexión.

**Imagen 34.** Equipo desechable del sistema Sepax®  
(Tomado de Rodríguez L.)(111)

El protocolo de lavado sería el siguiente (imagen 35). Tras conectar las bolsas de muestra y de solución de lavado, la cámara centrífuga retira el émbolo y así 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.

El proceso consume una media de 28 minutos y el volumen final de la muestra es de 100 mL. Para cada proceso se prepararon un mínimo de 300 mL de solución de lavado.

## MATERIAL Y MÉTODOS



**Imagen 35.** Esquema del protocolo de lavado Sepax®. (Tomado de Rodríguez L.)(111)

### 3.5. Soluciones

A continuación se detalla la composición de las soluciones empleadas para el lavado de los PH criopreservados tras ser descongelados:

#### Solución Salina Albúmina (SSA)

Solución Salina-Albúmina (SSA) compuesta por:

-Suero salino al 0,9% (Braun Medical, España): 82,5 mL por cada 100 mL de solución final

-Citrato de dextrosa fórmula A (ACD-A, Baxter S.A., lessines, Belgium SA): 5mL por cada 100 mL de solución final.

-Albúmina humana al 20% (Grifols, España): 12,5 mL por cada 100 mL de solución final. La concentración final de Albúmina fue un 2,5 %

Para cada proceso se preparó un mínimo de 300 mL de solución de lavado. Esta solución se utilizó preenfriada a 4°C.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Voluven® : Hidroxietil almidón (HES 130/0,4) (Fresenius Kabi, España)

Cada 1000 ml contiene:	
Poli (O-2-hidroxietil) almidón (Sustitución molar: 0,38-0,45) (Peso molecular medio: 130.000 Da)	60,00 g
Cloruro sódico	9,00 g
<b>Electrolitos:</b>	
Cl <sup>-</sup>	154 mmol/l
Na <sup>+</sup>	154 mmol/l
Osmolaridad teórica	308 mosmol/l
pH	4,0 – 5,5
Acidez titulable	< 1,0 mmol NaOH/l
Lista de excipientes:	
Hidróxido de sodio (para ajustar pH)	
Ácido clorhídrico (para ajustar pH)	
Agua para inyectables.	

#### 4. Controles

Los controles sobre las muestras que se realizaron para cada uno de los procesos a lo largo del procedimiento se esquematizan en la tabla 11:

Previa aféresis	½ aféresis	Final aféresis	Post-descongelado	Post- lavado
CNT*	CNT*	CNT*	CNT*	CNT*
CD34 <sup>+</sup>	CD34 <sup>+</sup>	CD34 <sup>+</sup>	CD34 <sup>+</sup>	CD34 <sup>+</sup>
		Cultivos de Colonias	Cultivos de colonias	Cultivos de Colonias
		Viabilidad**	Viabilidad	Viabilidad
		Cultivos microbiológicos**		Cultivos microbiológicos

**Tabla 11.** Controles realizados en la muestras de PH a lo largo del proceso (\*células nucleadas totales, \*\* tras la adición de plasma y DMSO)

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Recuentos celulares

A lo largo de todo el procedimiento se realizaron recuentos celulares de CNT mediante contadores celulares automáticos en diversas etapas (figura X). Todas las muestras se diluyeron hasta una proporción de 1:10 con suero salino antes de los recuentos automáticos, para evitar errores debido a la pérdida de linealidad del contador por exceso de concentración celular.

Para el análisis estadístico se han tenido en cuenta los recuentos de la muestra tomados de:

- 1) Bolsas de recolección de aféresis **antes** de la adición de DMSO.
- 2) Bolsas post-descongelación de los PH
- 3) Bolsas post-lavado de los PH.

La variable estudiada es el número de CNT por cada bolsa lavada o el promedio de bolsas lavadas juntas cuando fue el caso.

La fórmula utilizada para el cálculo de las CNT es la siguiente:

$$\text{CNT} = \text{Leucocitos} \times 10^6 / \text{mL en muestra diluida al 1:10} \times \text{volumen de la bolsa en mL} \times 10$$

### 4.2. Cultivos de progenitores hematopoyéticos

Los cultivos clonogénicos para colonias granulomacrofágicas y eritroides del producto de aféresis se realizaron por siembra directa, realizando previamente una dilución en PBS de las células obtenidas de las bolsas. Se cursaron en el producto fresco previo a la criopreservación (antes de la adición del DMSO), inmediatamente tras la descongelación e inmediatamente tras el lavado.

Para los cultivos celulares de sangre periférica se obtuvieron las CMN mediante separación por gradiente de densidad 50/50 con Ficoll (densidad 1,077g/mL) centrifugando a 540 g/minuto durante 30 minutos a 19°C. La capa celular sobre el Ficoll se recogió con una pipeta Pasteur y se lavó dos veces con PBS a 1000g/minuto durante 10 minutos. Finalmente se resuspendieron en PBS a la concentración adecuada para sembrarlas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

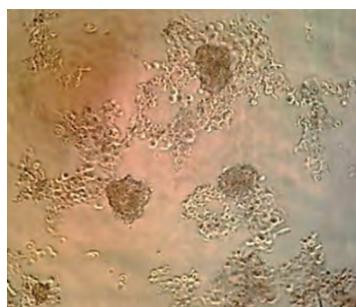
Los cultivos clonogénicos se realizaron en medio semisólido Iscove's MDM y metilcelulosa comercial (Methocult H4434; Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) que contenía: suero bovino fetal, rh-SCF (recombinant human stem-cell factor), GM-SCF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), rhIL-3 (recombinant human interleukine 3), 2-mercaptoetanol, L-glutamina y rh-eritropoyetina.

Se sembraron  $2 \times 10^4$  células mononucleadas por placa, utilizándose 2 placas por muestra e incubándolas durante 14 días en una estufa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y en ambiente saturado de humedad. Finalizado ese plazo, las placas se examinaron en fresco mediante un microscopio de luz invertida (imagen 36). Se contó el número de colonias por placa calculando la media de éstas para las 2 placas utilizadas por muestra y se calculó el número total de colonias mediante la siguiente fórmula:

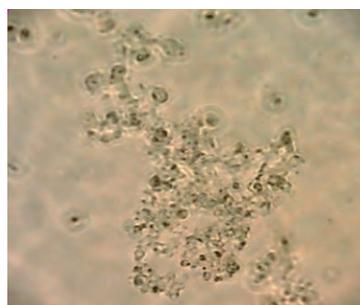
$$\text{N}^\circ \text{ colonias totales} (\times 10^4): \text{media del n}^\circ \text{ colonias en 2 placas} \times \text{n}^\circ \text{ células totales} / 20.000$$



Colonia Eritroide



Colonia Eritroide y Granulo monocíticas



Colonia Granulomonocíticas

**Imagen 36.** Imágenes de colonias clonogénicas de PH

### 4.3. Viabilidad celular

La viabilidad se refiere al porcentaje de células vivas y se determinó con el método de exclusión de azul tripán (Trypan blue, Difco laboratorios, West Molesey, Surrey, UK), utilizando una dilución de éste al 0.2% con suero salino y mezclándolo con la suspensión celular, volumen a volumen, para examinarlo al microscopio. El azul tripán es un coloide que permite diferenciar las células vivas de las células muertas. Las células vivas con la membrana celular intacta no son coloreadas debido a que éstas son muy selectivas a los compuestos que dejan pasar a través de la membrana, de manera que el azul de tripano no es absorbido y por lo tanto la célula se muestra refringente. Sin embargo, sí atraviesa la membrana de las células muertas y por lo tanto se ven azules.

La viabilidad se determinó en:

- 1) Bolsas de recolección de aféresis tras la adición de DMSO.
- 2) Bolsas post-descongelación de los PH.
- 3) Bolsas post-lavado de los PH.

Esta técnica proporciona información del estado general de las células descongeladas pero no del subconjunto de células CD34<sup>+</sup>. No existe correlación entre la tinción de viabilidad, la recuperación de CNT vivas y la formación de colonias (255,256), debido a la baja proporción de progenitores en el conjunto de las CNT, aprox el 1,7% en CPH-A, por lo que la viabilidad y el recuento de CNT son poco informativos de la capacidad clonogénica del producto. Únicamente viabilidades < 50% predicen una pérdida significativa de la capacidad clonogénica de los injertos in vitro (257).

### 4.4. Cultivos bacteriológicos

Los cultivos bacteriológicos se realizaron en dos momentos del proceso:

- 1) Bolsa de recolección de aféresis inmediatamente tras la adición de DMSO.
- 2) Bolsas post-lavado de los PH.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Procedimiento: Se inyectó 1 ml de las muestras correspondientes en botellas de cultivo de aerobios y anaerobios BacT/ALERT® (Bio-Mérieux, Marcy-l'Etoile, Ródano, Italia), se incubaron y se analizaron para la detección de bacterias de forma diaria durante una semana. Las muestras positivas en la tinción de Gram se sembraron en diferentes medios de cultivo según el resultado (agar chocolate, agar sangre, SCS, Mc Conkey y agar Saboraud dextrosa) para la identificación de la bacteria y antibiograma.

### 4.5. Análisis y cuantificación de las células CD 34<sup>+</sup>

El procedimiento utilizado en la Sección de Citometría e Inmunología tumoral del Hospital C. U. Virgen de la Arrixaca para analizar y cuantificar mediante citometría de flujo multiparamétrica en doble plataforma (contador hematológico y citómetro de flujo) las células progenitoras hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>, se basa en los criterios establecidos por ISHAGE (48). Para ello se utiliza un kit comercial con marcado de la comunidad europea (Europea 98/79/EC para In Vitro Diagnostic Medical Devices), Stem cell kit (BD) que permite la cuantificación en cifras porcentuales de la células CD34<sup>+</sup>. El número absoluto de las distintas poblaciones estudiadas se cuantificó a partir del porcentaje obtenido mediante citometría de flujo y el número de leucocitos por microlitro obtenidos en el contador hematológico.

El kit descrito permite el estudio de células CD34<sup>+</sup>, mediante una triple tinción con anticuerpos monoclonales dirigidos frente a **CD34** (conjugado con Phicoeritrina, PE) que identifica células inmaduras, **CD45** (conjugado con Fluoresceina, FITC) que permite la identificación de todos los leucocitos y también diferencia las distintas poblaciones mediante la intensidad de expresión del CD45 y la granularidad de las mismas {CD45<sup>+++</sup>-SSC bajo (linfocitos); CD45<sup>++</sup>- SSC intermedio (Monocitos), CD45<sup>+</sup>- SSC ( granulocitos)} y con **7-AAD** (7-Actinomicina D) marcador fluorescente con capacidad de unirse al DNA, que permite discriminar las células viables, no teñidas al mantener su membrana celular intacta, de las apoptóticas y necróticas que se tiñen al tener su membrana dañada. La identificación de las células CD34<sup>+</sup> tienen que cumplir 3 criterios:

1. Ser células CD34<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup>débil (intensidad inferior a la de los linfocitos).
2. Tener un tamaño (FSC) y granulación (SSC) intermedio/bajo.
3. Ser viables (7-AAD negativas).

## MATERIAL Y MÉTODOS

A estos marcadores se añade un anticuerpo dirigido frente a monocitos **CD14** (conjugado en Aloficocianina, APC). Esto permite la identificación de las células monocitarias CD45<sup>++</sup>CD14<sup>+</sup>, en combinación con SSC, la identificación de linfocitos (SSC reducido y CD14<sup>-</sup>) y granulocitos (SSC elevado y CD14<sup>-</sup>).

Para el análisis de las células progenitoras hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> mediante citometría de flujo se recogieron muestras de:

- 1) Bolsas de recolección de aféresis antes de la adición del DMSO.
- 2) Bolsas post-descongelación de los PH.
- 3) Bolsas post-lavado de los PH.

### Reactivos

- Stem cell enumeration kit (Becton Dickinson):
  - anti-CD45 FITC
  - anti-CD34 PE
  - CD14 APC
  - 7-Actinomicina D
  - Tubos Truecount
  - Lisante 10X (cloruro de amonio)
- Consumibles del FACSCanto-II (Becton Dickinson):
  - FACSFlow
  - Shutdown solution
  - Cleaning solution

### Equipamientos:

1. Citometro de flujo FACSCanto-II (Becton Dickinson)
2. FACSDiva Software (Becton Dickinson)

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Procedimiento:

- 1) Una vez conocido el recuento celular del contador hematológico, se ajustó la concentración celular a 10-15 millones por  $\mu\text{l}$  diluyendo la muestra con FACSFlow.
- 2) Se dispensó en un tubo 10  $\mu\text{l}$  del coctel **CD45/CD34**, 10  $\mu\text{l}$  de **7-AAD** y 2,5  $\mu\text{l}$  de **CD14 APC**; y se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de la muestra, agitando el tubo e incubándolo 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- 3) Se lisaron los hematíes con solución hipotónica (1 ml de la solución lisante 1X del kit diluido al 1/10 con agua destilada), agitando en el vortex para favorecer la lisis y dejando incubar 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- 4) Se procedió a la adquisición de 100.000 eventos en el citómetro de flujo FACSCanto-II (BD), analizándolos con el programa informático FACS Diva (Becton-Dickinson, San José, CA., USA) siguiendo el protocolo de análisis de la International Society for Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) (48).

## 5. Variables medidas

Las variables demográficas de los pacientes y las características de las enfermedades de ambos grupos se recogieron a partir de la historia clínica. 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.

### 5.1. Variables clínicas

- 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.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.2. Variables del producto celular

Analizamos las características del producto celular en la bolsa de aféresis, al descongelarla y al lavarla, estructurándolo de la siguiente manera:

- ▶ Análisis cuantitativo: medias de las diferencias y las recuperaciones de células CD 34+ y CNT.
- ▶ Análisis funcional: medias de las diferencias y las recuperaciones de colonias granulomacrofágicas y eritroides y la viabilidad.
- ▶ Análisis de seguridad: comparación de la tasa de contaminación bacteriana entre el producto de aféresis y el producto lavado.

Las variables analizadas se detallan en la tabla 12:

**Tabla 12.** Variables del producto celular analizado

PH bolsas aféresis	PH descongelados	PH lavados
CNT aféresis (x10 <sup>6</sup> )	CNT descongelados (x10 <sup>6</sup> )	CNT lavados (x10 <sup>6</sup> )
CD34 aféresis (x10 <sup>6</sup> )	CD 34 descongelados (x10 <sup>6</sup> )	CD 34 lavados (x10 <sup>6</sup> )
CFU-GM aféresis (x10 <sup>6</sup> )	CFU-GM descongelados (x10 <sup>6</sup> )	CFU-GM lavados (x10 <sup>6</sup> )
BFU-E aféresis (x10 <sup>6</sup> )	BFU-E descongelados (x10 <sup>6</sup> )	BFU-E lavados (x10 <sup>6</sup> )
VIABILIDAD aféresis	VIABILIDAD descongelados	VIABILIDAD lavado
Microbiología aféresis		Microbiología lavados

### 5.3. Variables del injerto hematopoyético

- 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/ $\mu$ L).
- 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/ $\mu$ L).

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Día del trasplante en el que se produjo el injerto de plaquetas (primer día con cifra superior a 20.000 plaquetas/ $\mu$ L mantenida sin requerimiento transfusional).
- Número de concentrados de hematíes y número de pools de plaquetas transfundidos durante el procedimiento del trasplante.

### 5.4. Variables de seguridad en el paciente

- Aislamientos microbiológicos en los pacientes.
- Número de días de fiebre durante el procedimiento del trasplante.
- Número de días de hospitalización (contando a partir del día 0).
- Ausencia o presencia de efectos adversos de 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.
- Cifras de creatinina basal (antes de la infusión) y en el momento del alta hospitalaria.

### 6. Construcción de variables para la comparación de diferentes momentos del procedimiento entre ambos subgrupos y análisis estadístico empleado

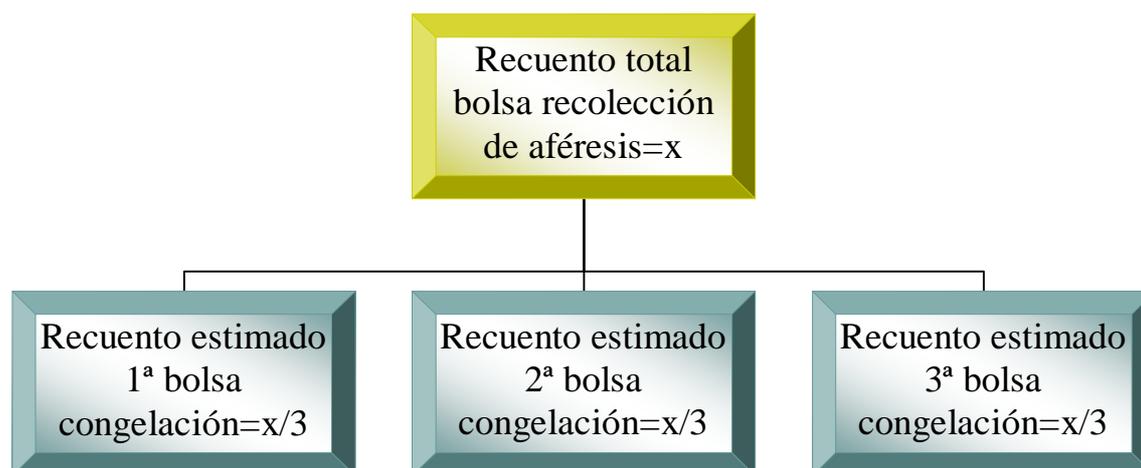
Para las variables del producto celular, los resultados los expresamos en términos de medias  $\pm$  error estándar de la media y de recuperaciones porcentuales para cada una de las variables cuantitativas estudiadas y comparamos entre sí diferentes momentos del procedimiento, para describir el comportamiento de dichas variables en cada paso.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para el cálculo de las recuperaciones aplicamos, según el momento analizado, las siguientes fórmulas:

- I. Comparación de los datos obtenidos de las bolsas de recolección de aféresis con los de las bolsas lavadas (lavadas/aféresis x 100).
- II. Comparación de los datos obtenidos de las bolsas de recolección de aféresis con los de las bolsas descongeladas no lavadas (descongeladas/aféresis x 100).
- III. Comparación de los datos obtenidos de las bolsas descongeladas con los de las bolsas lavadas (lavadas/descongeladas x 100).

En el análisis estadístico, además del análisis de las variables realizado para cada una de las bolsas sometidas a lavado (variables por lavado), hemos diseñado unas nuevas variables a partir de la agregación de las primeras. Para ello agrupamos los datos por proceso y por trasplante, con el objetivo de contrastar los resultados y recabar la máxima información. Esta agregación es necesaria para analizar los datos correspondientes al momento final de la aféresis, debido a que las muestras se toman de la bolsa de recolección de aféresis, pero tras el procesamiento de la bolsa y su distribución en las bolsas de criopreservación ya no se realizan más controles hasta su posterior descongelación. Por lo tanto, partimos de la premisa de que el reparto es equitativo en las bolsas procesadas a partir de la bolsa de aféresis.



**Imagen 37.** Representación esquemática de los recuentos celulares en un proceso de aféresis en el supuesto de que se haya congelado en tres bolsas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

De forma que tenemos:

- **Variables por Lavado:** utilizando los datos de cada una de las bolsas lavadas o la suma de las bolsas lavadas juntas cuando fue el caso.
- **Variables por Proceso:** suma del total de bolsas de un mismo proceso que se infunden al paciente en un trasplante. Denominamos proceso a cada uno de los procedimientos de aféresis que fueron necesarios para recolectar un número suficiente de PH para el trasplante.
- **Variables por Trasplante:** suma del total de bolsas que se infundieron al paciente en dicho trasplante. Estas bolsas pueden provenir de un único proceso de aféresis o de varios distintos.

Para el análisis de las recuperaciones se ha utilizado el análisis de la varianza tomando como variable independiente los subgrupos realizados en base al tipo de solución de lavado empleada. Para una mejor comprensión de las recuperaciones se utiliza también el análisis de la varianza de medidas repetidas, tomando como variables dependientes las utilizadas para el cálculo de la recuperación y como variable independiente los dos subgrupos anteriores.

Para las variables de injerto, el estudio comparativo entre ambos subgrupos de lavado, se hizo con el test t-Student para muestras independientes.

Para las variables de seguridad en el paciente, se utilizó el test t-Student para muestras independientes, en el caso del análisis correspondiente a los días de fiebre y días de hospitalización, y el test de Chi-cuadrado para el análisis de la tasa de aislamientos microbiológicos en los pacientes. Para el estudio comparativo entre las cifras de creatinina basal y al alta entre ambos subgrupos, se utilizó el análisis de la varianza de medidas repetidas. Respecto a las reacciones adversas y dada la muy baja incidencia de presentación, hicimos una descripción de cada uno de los casos.

El análisis descriptivo de las variables clínicas, se realiza de la muestra global y de los subgrupos realizados en base al tipo de solución de lavado empleada. Las variables cuantitativas se expresan con las medias  $\pm$  error estándar de la media y las variables cualitativas en frecuencias y porcentajes.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para comparar entre ambos subgrupos empleamos el test T-student para datos independientes cuando se trata de variables cuantitativas y el test de Chi-cuadrado para variables cualitativas.

En todos los análisis se ha considerado como umbral de significación el valor de  $p < 0,05$ , para rechazar la hipótesis nula y concluir que las diferencias encontradas eran significativas.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS v.20.0.

## MATERIAL Y MÉTODOS

RESULTADOS

**RESULTADOS**

## RESULTADOS

## RESULTADOS

### 1. Características de los pacientes en los dos subgrupos

En la tabla 13 se comparan las principales variables referentes a las características de los pacientes en ambos subgrupos. Para comparar las variables cuantitativas (edad, peso, número de infusiones por TPH y número de líneas de tratamiento por TPH) aplicamos el test T-student para datos independientes y para las variables cualitativas (sexo, diagnóstico y acondicionamiento) el Test de Chi-cuadrado. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables analizadas.

**Tabla 13.** Características de los pacientes en ambos subgrupos.

Variables	Lavado SSA	Lavado Voluven	<i>p</i>
<b>Sexo</b>			
<b>Mujeres</b> (número (%))	34 (35,4%)	23 (37,1%)	
<b>Hombres</b> (número (%))	62 (64,6%)	39 (62,9%)	0,866
<b>Edad</b> (media±SEM)	45,90 (±1,94)	45,39 (±2,47)	0,871
<b>Peso</b> (media±SEM)	68,38 (±2,14)	73,66 (±3,04)	0,146
<b>Diagnóstico*</b> (número (%))			
1. Mieloma y otras gammopatías monoclonales	38 (39,6%)	21 (33,9%)	
2. Leucemias agudas y síndromes mielodisplásicos	4 (4,2%)	8 (12,9%)	
3. Linfomas	40 (41,7%)	27 (43,5%)	0,182
4. Tumores sólidos y enfermedades autoinmunes	14 (14,6%)	6 (9,7%)	
<b>Líneas de tratamiento previo TPH</b> (media±SEM)	1,84 (±0,08)	1,84 (±0,13)	0,977
<b>Número de aféresis por TPH</b> (media±SEM)	1,35 (±0,06)	1,27 (±0,07)	0,386
<b>Número de infusiones por TPH</b> (media±SEM)	2,59 (±0,18)	2,76 (±0,17)	0,546

**SEM:** error estándar de la media. **TPH:** Trasplante de progenitores hematopoyéticos. **SSA:** Suero salino y Albúmina. \***La variable diagnóstico** contiene cuatro grupos principales y dentro de cada uno de ellos tenemos las patologías mostradas a continuación en la tabla 14.

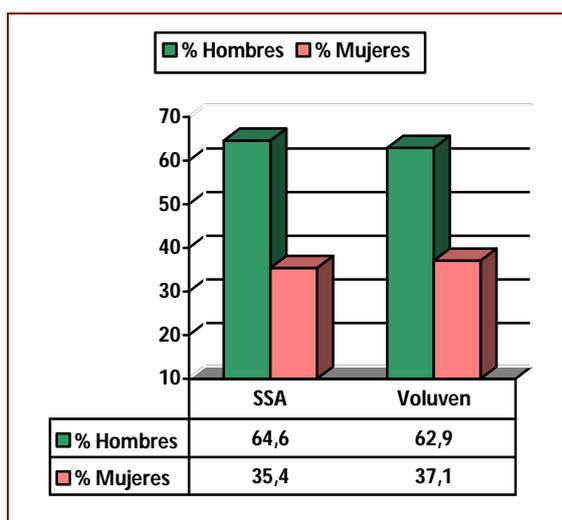
## RESULTADOS

**Tabla 14.** Patologías en los 4 grupos de diagnósticos principales

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Mielomas Sd.Poems Amiloidosis	Leucemia mieloide aguda Leucemia linfoide aguda Síndromes mielodisplásicos	L.Prolinfocítica Linfoma Cerebral primario Linfoma Linfoblástico T Linfoma Plasmablástico Linfoma difuso de célula grande B Linfoma difuso de célula grande B mediastínico Linfoma Burkitt-Like Linfoma Anaplásico Linfoma Manto Enfermedad Castleman Linfoma Folicular Enfermedad Hodgkin	Tumor células germinales Neuroblastoma Sarcoma Ewing Meduloblastoma Tumor de Wilms Anemia Fanconi Cáncer de mama Cáncer de ovario Esclerosis Múltiple

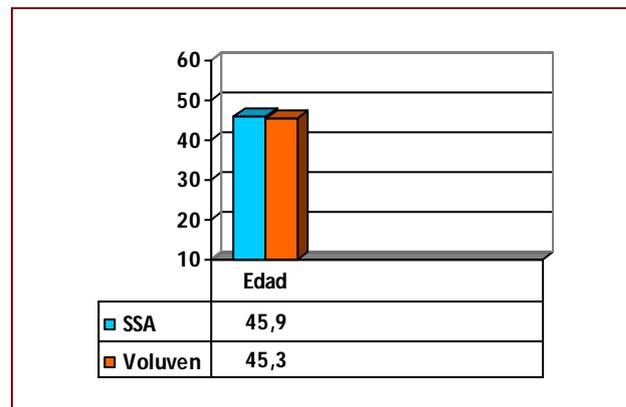
A continuación, se muestra la expresión gráfica de los resultados referentes a las características de los pacientes en los dos subgrupos.

**Gráfico1.** Distribución por sexo en ambos subgrupos

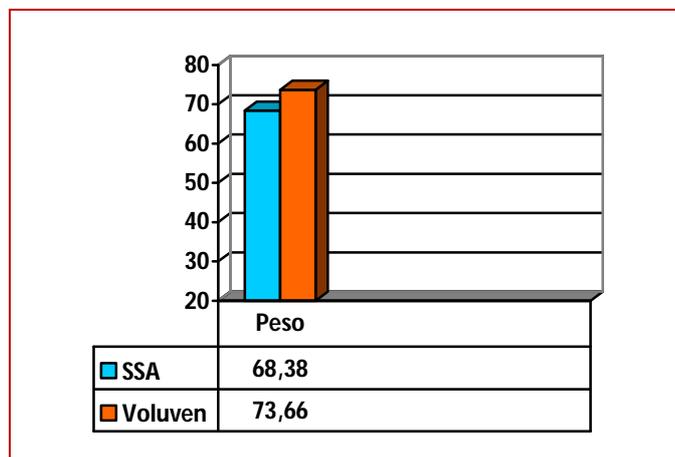


## RESULTADOS

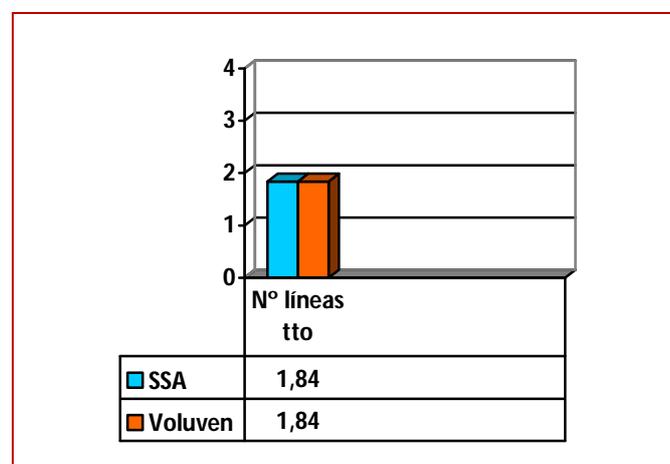
**Gráfico 2.** Distribución por edad en ambos subgrupos



**Gráfico 3.** Distribución por peso en ambos subgrupos



**Gráfico 4.** Distribución por número de líneas de tratamiento previas en ambos subgrupos



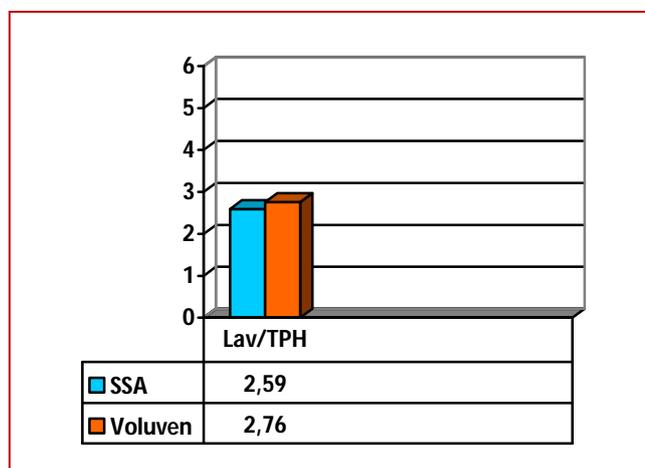
## RESULTADOS

La distribución de los pacientes en ambos subgrupos según el número de líneas de tratamiento recibidas previamente al trasplante se muestra en la tabla 15.

**Tabla 15.** Distribución por número de líneas de tratamiento en cada subgrupo

Tipos lavados	Nº líneas tratamiento	0	1	2	3	4	≥5	Total
SSA	Número (%)	2 (2,1)	32 (34,0)	42 (44,7)	15 (16,0)	3 (3,3)	0 (0)	94 (100)
Voluven	Número (%)	1 (1,6)	24 (39,3)	28 (45,9)	2 (3,3)	5 (8,2)	1 (1,6)	62 (100)

**Gráfico 5.** Distribución por número de lavados realizados por trasplante



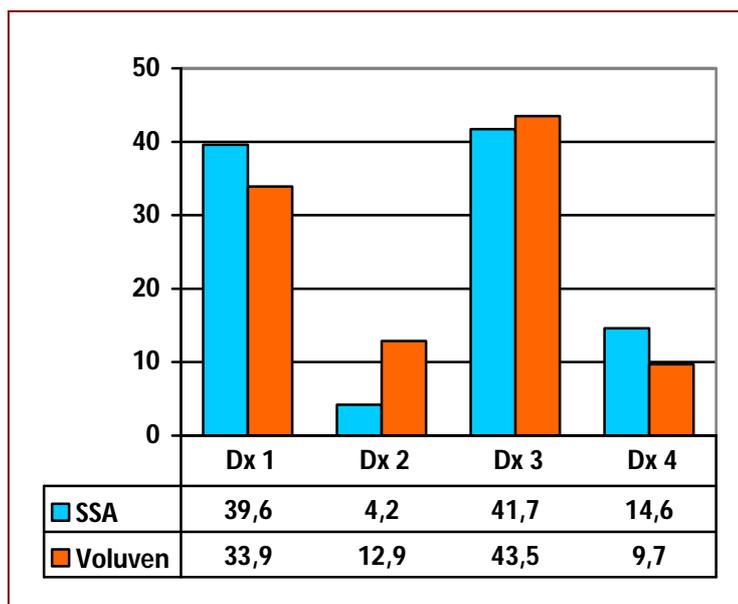
La distribución de los pacientes en ambos subgrupos según el número de bolsas lavadas por trasplante se muestra en la tabla 16.

**Tabla 16.** Distribución por el número de bolsas infundidas por trasplante en cada subgrupo

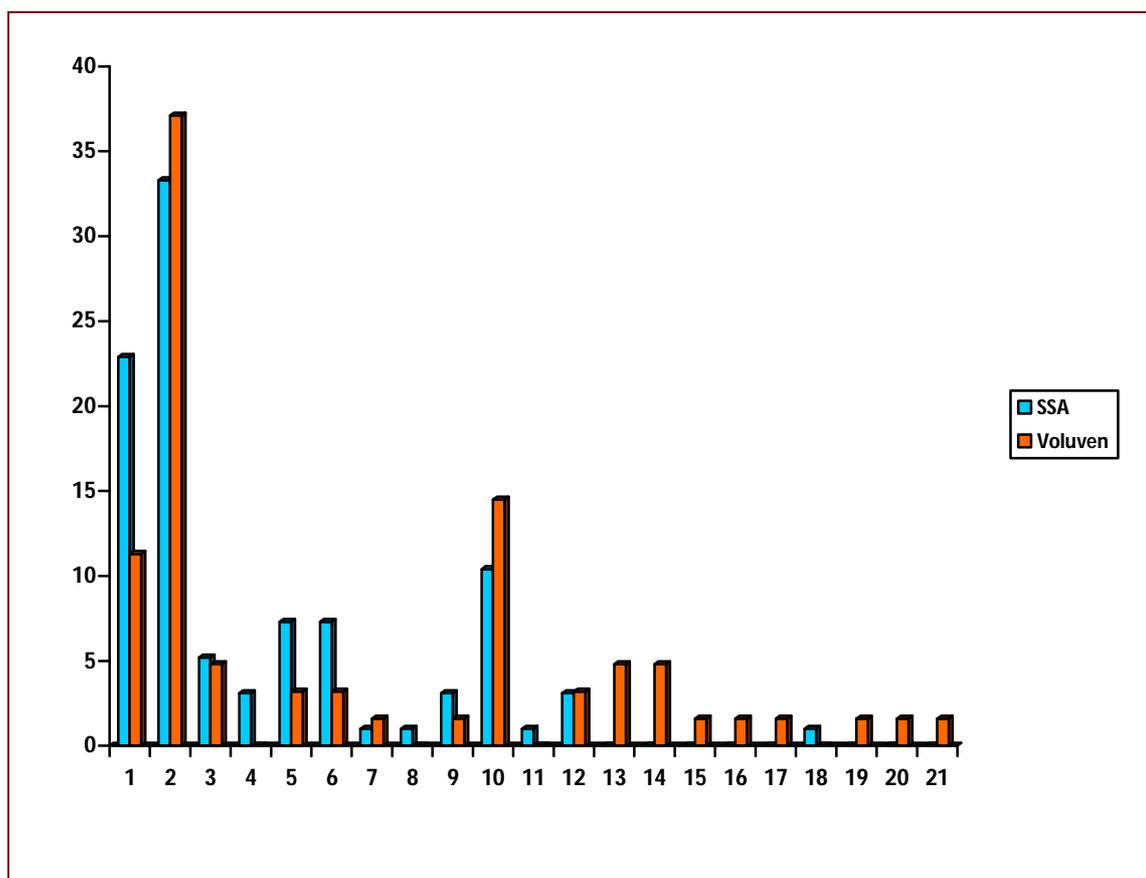
Tipos lavados	NºLavados/TPH	1	2	3	4	5	6	7	8	Total
SSA	Número (%)	29 (30,2)	35 (36,5)	11 (11,5)	8 (8,3)	4 (4,2)	1 (1,0)	5 (5,2)	3 (3,1)	96 (100)
Voluven	Número (%)	8 (12,9)	25 (40,3)	12 (19,4)	12 (19,4)	3 (4,8)	0 (0)	2 (3,2)	0 (0)	62 (100)

## RESULTADOS

**Gráfico 6.** Distribución de lavados (%) por diagnóstico:



**Gráfico 7.** Distribución de lavados (%) por acondicionamientos:



Nota: Las equivalencias a los códigos numéricos de los acondicionamientos están detallados en la tabla 17

## RESULTADOS

En la tabla 17 se comparan los regímenes de acondicionamiento por lavados, mediante el Test de Chi-cuadrado. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,097$ ).

**Tabla 17.** Distribución por acondicionamientos en ambos subgrupos

<b>ACONDICIONAMIENTOS</b> (ordenados por el código numérico equivalente)	<b>SSA</b> Nº (%)	<b>Voluven</b> Nº (%)	<b>Total</b> Nº (%)
1. Melfalán 200 mg/m <sup>2</sup> ( <b>Mel 200</b> )	22 (22,9)	7 (11,3)	29 (18,4)
2. Carmustina o BCNU 300 mg/ m <sup>2</sup> + Etopósido 800 mg/m <sup>2</sup> + Citarabina 1600 mg/m <sup>2</sup> + Melfalán 140 mg/m <sup>2</sup> ( <b>BEAM</b> )	32 (33,3)	23 (37,1)	55 (34,8)
3. Ciclofosfamida 120 mg/Kg+ Irradiación corporal total 12 Gy ( <b>Cy-ICT</b> )	5 (5,2)	3 (4,8)	8 (5,1)
4. Ciclofosfamida 200 mg/Kg + Globulina antitimocítica de conejo 6 mg/Kg ( <b>Cy200-ATG</b> )	3 (3,1)	0 (0)	3 (1,9)
5. Melfalán 140 mg/m <sup>2</sup> ( <b>Mel 140</b> )	7 (7,3)	2 (3,2)	9 (5,7)
6. Busulfán iv 12,8 mg/Kg + Melfalán 140 mg/m <sup>2</sup> ( <b>BuMel</b> )	7 (7,3)	2 (3,2)	9 (5,7)
7. Tiotepa 600 mg/m <sup>2</sup> + Carboplatino 1200 mg/m <sup>2</sup> ( <b>TT-CARBO</b> )	1 (1)	1 (1,6)	2 (1,3)
8. Fludarabina 125 mg/m <sup>2</sup> + Busulfan 6,4 mg + Tiotepa 10 mg/kg+ Metilprednisolona 25 mg/kg ( <b>FLUBU-TT</b> )	1 (1)	0 (0)	1 (0,6)
9. Busulfán iv 12,8 mg/Kg + Ciclofosfamida 120 mg/Kg ( <b>BUCY</b> )	3 (3,1)	1 (1,6)	4 (2,5)
10. Busulfán iv 9,6 mg/Kg + Melfalán 140 mg/m <sup>2</sup> ( <b>Bumel</b> )	10 (10,4)	9 (14,5)	19 (12)
11. Fludarabina 120 mg/m <sup>2</sup> + Ciclofosfamida 200 mg/Kg + ATG 7,5 mg/Kg ( <b>FLUCY-ATG</b> )	1 (1)	0 (0)	1 (0,6)
12. Tiotepa 10 mg/Kg + Carmustina o BCNU 400 mg/m <sup>2</sup> ( <b>Tiotepa-BCNU</b> )	3 (3,1)	2 (3,2)	5 (3,2)
13. Melfalán 70 mg/m <sup>2</sup> ( <b>Mel 70</b> )	0 (0)	3 (4,8)	3 (1,9)
14. Busulfán iv 12,8 mg/Kg + Etopósido 40 mg/Kg + ARA-C 12.000 mg/m <sup>2</sup> ( <b>BEA</b> )	0 (0)	3 (4,8)	3 (1,9)
15. Carboplatino AUC 20 mg min/mL + Etoposido 1000 mg/m <sup>2</sup> + Melfalan 180 mg/m <sup>2</sup> ( <b>CARBO-VP-16-MEL ped</b> )	0 (0)	1 (1,6)	1 (0,6)
16. Etoposido 1800 mg/m <sup>2</sup> + Carboplatino 1600 mg/m <sup>2</sup> + Ciclofosfamida 6400 mg/m <sup>2</sup> ( <b>VP-16-CARBO-CY</b> )	0 (0)	1(1,6)	1 (0,6)
17. Fludarabina 150 mg/m <sup>2</sup> + Melfalan 140 mg/m <sup>2</sup> + Campath 50mg ( <b>FLUMEL-CAMPATH</b> )	0 (0)	1 (1,6)	1 (0,6)
18. Cisplatino 100 mg/m <sup>2</sup> +Etoposido 1500 mg/m <sup>2</sup> + Ifosfamida 10000 mg/m <sup>2</sup> ( <b>PEI</b> )	1 (1)	0 (0)	1 (0,6)
19. Fludarabina 120 mg/m <sup>2</sup> + ATG 3 mg/kg + ICT 2 Gy ( <b>FLU-ATG-ICT</b> )	0 (0)	1 (1,6)	1 (0,6)
20. Fludarabina 160 mg/m <sup>2</sup> +Busulfan 12,8 mg/Kg + ATG 6 mg/Kg ( <b>FLUBU-ATG</b> )	0 (0)	1 (1,6)	1 (0,6)
21. Etoposido 1500 mg/m <sup>2</sup> + Carboplatino 1500 mg/m <sup>2</sup> + Ifosfamida 10000 mg/m <sup>2</sup> ( <b>VP-16-CARBO-Ifosfamida</b> )	0 (0)	1 (1,6)	1 (0,6)

## RESULTADOS

### 2. Estudio del producto celular

#### 2.1. Características de los productos celulares en los dos subgrupos, en el momento final de aféresis, inmediatamente tras la descongelación y tras el lavado

Comparamos las medias de los distintos recuentos celulares de PH (CNT x 10e6, CD34<sup>+</sup> x 10e6, CFUGM x 10e6, BFUE x 10e6, Viabilidad y Microbiología), entre cada uno de los subgrupos por tipo de lavado, aplicando el análisis de la varianza. Lo hacemos en el momento de la aféresis, tras la descongelación y tras el lavado.

##### 2.1.1. Recuentos celulares en la bolsa de aféresis

Los resultados muestran una diferencia significativa en el recuento de las colonias CFU-GM y BFU-E, de tal manera que, el recuento de CFU-GM es mayor en el grupo que se someterá a lavado con SSA y por el contrario el recuento de BFU-E es más rico en el grupo lavado con Voluven®. En el resto de variables estudiadas no encontramos diferencias significativas en la aféresis (tabla 18).

**Tabla 18.** Recuentos celulares en cada uno de los subgrupos al final de la aféresis

Variable	lavado SSA	lavado Voluven	<i>p</i>
CNT (x10 <sup>6</sup> )	18717,04 (±695,51)	18227,20 (±405,63)	0,569
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	111,84 (±8,86)	112,17 (±10,68)	0,910
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	33,59 (±2,15)	26,06 (±2,03)	0,020
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	26,47 (±1,83)	37,83 (±2,30)	<0,001
Viabilidad	91,30 (±0,63)	92,66 (±0,80)	0,167
Microbiología	0,06 (±0,015)	0,07 (±0,018)	0,700

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Análisis de la varianza)

En la tabla 19 se realiza el mismo análisis pero solo para las variables CNT y CD34<sup>+</sup> calculadas por kilogramo de peso del paciente y por trasplante.

**Tabla 19.** Variables por Kg de peso del paciente por trasplante al final de la aféresis

Variable	TPH lavado SSA	TPH lavado Voluven	<i>p</i>
CNTx10 <sup>8</sup> /kg	6,59 (±0,60)	7,41 (±0,55)	0,349
CD34x 10 <sup>6</sup> /Kg	4,05 (±0,30)	4,60 (±0,51)	0,326

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Análisis de la varianza)

## RESULTADOS

### 2.1.2. Recuentos celulares inmediatos a la descongelación de las bolsas

Los resultados muestran una diferencia significativa en el recuento de las CNT, las colonias BFU-E y la viabilidad. Así, el recuento de CNT es mayor en el grupo lavado con SSA y el recuento de BFU-E y la viabilidad es mayor en el grupo lavado con Voluven®. En el resto de variables estudiadas no encontramos diferencias significativas en el momento inmediato a la post-descongelación (tabla 20).

**Tabla 20.** Recuentos celulares en cada uno de los subgrupos inmediatamente tras la descongelación (por bolsa)

Variable	lavado SSA	lavado Voluven	<i>p</i>
CNT (x10 <sup>6</sup> )	19641,69 (±457,04)	18143,25 (±413,03)	<b>0,018</b>
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	129,84 (±11,04)	111,20 (±11,94)	0,255
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	19,03 (±1,56)	16,78 (±1,60)	0,335
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	18,06 (±1,51)	33,54 (±2,73)	<b>&lt;0,001</b>
Viabilidad	74,82 (±0,77)	77,82 (±0,83)	<b>0,009</b>

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Análisis de la varianza)

En la tabla 21 se realiza el mismo análisis pero solo para las variables CNT y CD34<sup>+</sup> calculadas por kilogramo de peso del paciente, por trasplante.

**Tabla 21.** Variables por kg de peso del paciente por trasplante post-descongelación.

Variable	lavado SSA	lavado Voluven	<i>p</i>
CNT (x10 <sup>8</sup> /kg)	6,91 (±0,50)	7,30 (±0,55)	0,609
CD34 (x10 <sup>6</sup> /kg)	4,70 (±0,39)	4,83 (±0,68)	0,863

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Análisis de la varianza)

## RESULTADOS

### 2.1.3. Recuentos celulares tras el lavado de las bolsas

Los resultados muestran una diferencia significativa en el recuento de las colonias BFU-E, la viabilidad y la microbiología. El recuento de BFU-E y la viabilidad es mayor en el grupo lavado con Voluven®. Con respecto a la tasa de aislamientos microbiológicos positivos encontramos que es mayor en el grupo lavado con SSA. En el resto de variables estudiadas no encontramos diferencias significativas tras el lavado (tabla 22).

**Tabla 22.** Recuentos celulares en cada uno de los subgrupos tras el lavado (por bolsa)

Variable	lavado SSA	lavado Voluven	<i>p</i>
CNT (x10 <sup>6</sup> )	14448,37 (±330,08)	14368,98 (±364,11)	0,872
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	121,34 (±9,44)	111,95 (±12,05)	0,534
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	19,94 (±1,62)	18,70 (±1,58)	0,592
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	17,86 (±1,37)	33,86 (±2,52)	<0,001
Viabilidad	75,11 (±0,70)	78,17 (±0,78)	0,004
Microbiología	0,09 (±0,019)	0,04 (±0,014)	0,047

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Análisis de la varianza)

En la tabla 23 se realiza el mismo análisis pero solo para las variables CNT y CD34<sup>+</sup> calculadas por kilogramo de peso del paciente, por trasplante.

**Tabla 23.** Variables por kg de peso del paciente por trasplante tras el lavado

Variable	lavado SSA	lavado Voluven	<i>p</i>
CNT (x10 <sup>8</sup> /kg)	5,15 (±0,39)	5,76 (±0,42)	0,302
CD34 (x 10 <sup>6</sup> /kg)	4,38 (±0,35)	4,76 (±0,63)	0,567

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Análisis de la varianza)

## RESULTADOS

### **2.2. Estudio de los efectos de la congelación/descongelación sobre los progenitores hematopoyéticos**

A continuación, valoramos el efecto que tiene el proceso de congelación y descongelación sobre los progenitores hematopoyéticos, midiendo las variables estudiadas (CNT, CD 34, CFU-GM, BFU-E, Viabilidad) en el momento de la aféresis e inmediatamente después de la descongelación. También analizamos las recuperaciones de dichas variables.

Los resultados están expresados según la agregación de las variables, por bolsa, por proceso y por trasplante.

## RESULTADOS

### 2.2.1. Análisis por BOLSA

Los análisis realizados por bolsa, mostrados en la tabla 24, reflejan una pérdida significativa de colonias, tanto CFU-GM, BFU-E, y de la viabilidad tras el proceso de congelación/descongelación, y una ganancia significativa de las células CD34<sup>+</sup>. El recuento de CNT no experimenta un cambio significativo. En la tabla 25 se muestran los porcentajes de recuperación de células o colonias correspondientes.

**Tabla 24.** Comparaciones entre aféresis y descongelados por bolsa

Variable	Muestra total		p
	Aféresis	Descongelado	
CNT (x10 <sup>6</sup> )	18491 (±427,80)	18980,18 (±315,49)	0,189
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	111,98 (±6,83)	121,61 (±8,11)	0,013
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	30,44 (±1,51)	18,06 (±1,12)	<0,001
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	31,55 (±1,46)	24,99 (±1,52)	<0,001
Viabilidad	91,92 (±0,50)	76,16 (±0,56)	<0,001

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Anova de medidas repetidas)

**Tabla 25.** Recuperación entre aféresis y descongelados por bolsa

Recuperaciones de aféresis a descongelados por bolsa	
Muestra total	
CNT (x10 <sup>6</sup> )	108,29 % (±1,40)
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	108,49 % (±2,62)
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	79,80 % (±4,94)
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	132,26 % (±11,93)
Viabilidad	83,43 % (±0,71)

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media

## RESULTADOS

### 2.2.2. Análisis por PROCESO

Los análisis realizados por proceso, mostrados en la tabla 26, reflejan una pérdida significativa de colonias, tanto CFU-GM como BFU-E, y de la viabilidad tras el proceso de congelación/descongelación. El recuento de CNT y de células CD34<sup>+</sup> no experimenta un cambio significativo. En la tabla 27 se muestran los porcentajes de recuperación de células o colonias correspondientes.

**Tabla 26.** Comparaciones entre aféresis y descongelado por proceso

Variable	Muestra total		p
	Aféresis	Descongelado	
CNT (x10 <sup>6</sup> )	36035,77 (±1978,83)	36880,93 (±1469,24)	0,528
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	219,15 (±16,46)	236,33 (±19,99)	0,063
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	59,19 (±4,47)	35,23 (±2,62)	<0,001
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	61,48 (±4,35)	48,66 (±3,90)	0,002
Viabilidad	91,91 (±0,64)	76,86 (±0,71)	<0,001

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Anova de medidas repetidas)

**Tabla 27** Recuperación entre aféresis y descongelados por proceso

Recuperaciones de aféresis a descongelados por proceso Muestra total	
CNT (x10 <sup>6</sup> )	110,78 % (±2,09)
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	111,41 % (±3,58)
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	85,84 % (±6,55)
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	140,17 % (±15,55)
Viabilidad	83,47 % (±1,02)

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media

## RESULTADOS

### 2.2.3. Análisis por TRASPLANTE

Los análisis realizados por trasplante, mostrados en la tabla 28, reflejan una pérdida significativa de colonias, tanto CFU-GM como BFU-E, y de la viabilidad tras el proceso de congelación/descongelación. El recuento de CNT y de células CD34<sup>+</sup> no experimenta un cambio significativo. En la tabla 29 se muestran los porcentajes de recuperación de células o colonias correspondientes.

**Tabla 28** Comparaciones entre aféresis y descongelado por trasplante

Variable	Muestra total		p
	Aféresis	Descongelado	
CNT (x10 <sup>6</sup> )	47821,06 (±3327,36)	48942,62 (±2904,30)	,540
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	290,80 (±19,44)	313,63 (±24,28)	,065
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	78,58 (±5,73)	46,75 (±3,31)	<0,001
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	81,58 (±5,78)	64,52 (±5,20)	0,003
Viabilidad	91,55 (±0,76)	76,08 (±0,81)	<0,001

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Anova de medidas repetidas)

**Tabla 29.** Recuperación entre aféresis y descongelados por trasplante

Recuperaciones de aféresis a descongelados por trasplante	
Muestra total	
CNT (x10 <sup>6</sup> )	109,30 % (±2,14)
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	108,46 % (±3,63)
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	80,23 % (±6,07)
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	126,30 % (±14,27)
Viabilidad	83,84 % (±0,99)

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media

## RESULTADOS

### **2.3. Estudio de los efectos del procedimiento del lavado celular sobre los progenitores hematopoyéticos descongelados**

Estudiamos los efectos del lavado celular, para la eliminación del DMSO, sobre los PH criopreservados tras la descongelados. Planteamos el análisis, por un lado, sobre la muestra global sin tener en cuenta el tipo de lavado ("p" descongelados/lavados), y por otro lado, comparando ambos subgrupos según la solución de lavado empleada ("p" tipo de lavado x descongelado/lavado). Aplicamos el análisis de la varianza de medidas repetidas, tomando como variable independiente el tipo de lavado.

También analizamos las diferencias en las recuperaciones de dichas variables, utilizando el análisis de la varianza y la misma variable independiente.

Los resultados están expresados según la agregación de las variables, por bolsa, por proceso y por trasplante.

## RESULTADOS

### 2.3.1. Análisis por BOLSA

Los análisis realizados por bolsa, mostrados en la tabla 30, reflejan una pérdida significativa de CNT tras el lavado de los PH en el análisis del total de la muestra, siendo esta pérdida mayor para el subgrupo lavado con SSA. En el resto de variables estudiadas no encontramos diferencias significativas tras el proceso de lavado, ni en la muestra total ni comparando por tipo de lavado.

En la tabla 31 se muestran los porcentajes de recuperación de células o colonias correspondientes.

**Tabla 30.** Comparaciones entre descongelados y lavado por bolsa

Variable	SSA		Voluven		<i>p</i> desc/lav	<i>p</i> tipo de lavado x desc/lav
	Descongelado	Lavado	Descongelado	Lavado		
CNT (x10 <sup>6</sup> )	19641,69 (±457,04)	14448,37 (±330,08)	18143,25 (±413,03)	14368,98 (±364,11)	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	129,84 (±11,04)	121,34 (±9,44)	111,20 (±11,94)	111,95 (±12,05)	0,146	0,083
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	19,03 (±1,56)	19,94 (±1,62)	16,78 (±1,60)	18,70 (±1,58)	0,051	0,487
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	18,06 (±1,51)	17,86 (±1,37)	33,54 (±2,73)	33,86 (±2,52)	0,952	0,784
Viabilidad	74,82 (±0,77)	75,11 (±0,70)	77,82 (±0,83)	78,17 (±0,78)	0,537	0,950

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Anova de medidas repetidas)

"*p*" descongelados/lavados=comparación de la muestra global antes y después del lavado, partiendo del producto descongelado

"*p*" tipo de lavado x descongelado/lavado= comparación por subgrupos según tipo de solución de lavado, antes y después del lavado, partiendo del producto descongelado.

**Tabla 31.** Recuperación entre descongelado y lavado por bolsa

Variable	Tipo de lavado	
	SSA	Voluven
CNT (x10 <sup>6</sup> )	75,12 % (±0,96)	79,08 % (±1,09)
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	113,18 % (±3,81)	110,02 % (±3,27)
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	163,80 % (±10,26)	187,59 % (±17,62)
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	144,62 % (±11,88)	141,82 % (±11,24)
Viabilidad	102,02 % (±1,17)	101,59 % (±1,11)

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Análisis de la varianza)

## RESULTADOS

### 2.3.2. Análisis por PROCESO

Los análisis realizados por proceso, mostrados en la tabla 32, reflejan una pérdida significativa de CNT tras el lavado de los PH en el análisis del total de la muestra, sin encontrar diferencias por tipo de solución de lavado empleada para dicha variable. Respecto al análisis de las colonias CFU-GM en el total de la muestra, se observa una ganancia significativa tras el lavado, sin encontrar diferencias significativas en el comportamiento de las dos soluciones de lavado. En el resto de variables estudiadas no encontramos diferencias significativas, ni en la muestra total ni comparando por tipo de lavado.

En la tabla 33 se muestran los porcentajes de recuperación de células o colonias correspondientes.

**Tabla 32.** Comparaciones entre descongelados y lavado por proceso

Variable	SSA		Voluven		<i>p</i> desc/lav	<i>p</i> tipo de lavado x desc/lav
	Descongelado	Lavado	Descongelado	Lavado		
CNT (x10 <sup>6</sup> )	34599,60 (±1845,73)	25451,38 (±1483,00)	40542,33 (±2381,67)	32108,47 (±1971,61)	<b>&lt;0,001</b>	0,437
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	228,69 (±21,30)	213,82 (±18,79)	248,58 (±39,42)	250,25 (±37,89)	0,204	0,112
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	33,58 (±2,81)	35,17 (±2,94)	37,44 (±5,19)	41,96 (±5,39)	<b>0,035</b>	0,310
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	31,83 (±3,33)	31,45 (±3,13)	74,62 (±7,80)	75,99 (±7,56)	0,807	0,666
Viabilidad	75,75 (±0,90)	76,62 (±0,87)	78,68 (±1,14)	78,32 (±1,16)	0,754	0,375

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Anova de medidas repetidas)

**Tabla 33.** Recuperación entre descongelado y lavado por proceso

Variable	Tipo de lavado	
	SSA	Voluven
CNT (x10 <sup>6</sup> )	73,61 % (±1,21)	77,78 % (±1,22)
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	102,80 % (±3,07)	105,67 % (±3,02)
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	131,54 % (±7,31)	162,94 % (±23,98)
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	119,25 % (±7,57)	121,88 % (±8,35)
Viabilidad	101,93 % (±1,19)	99,98 % (±1,19)

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Análisis de la varianza)

## RESULTADOS

### 2.3.3. Análisis por TRASPLANTE

Los análisis realizados por trasplante, mostrados en la tabla 34, reflejan una pérdida significativa de CNT tras el lavado de los PH en el análisis del total de la muestra, sin encontrar diferencias por tipo de solución de lavado empleada para dicha variable. Respecto al análisis de las colonias CFU-GM en el total de la muestra, se observa una ganancia significativa tras el lavado, sin encontrar diferencias significativas en el comportamiento de las dos soluciones de lavado. En el resto de variables estudiadas no encontramos diferencias significativas, ni en la muestra total ni comparando por tipo de lavado.

En la tabla 35 se muestran los porcentajes de recuperación de células o colonias correspondientes.

**Tabla 34.** Comparaciones entre descongelados y lavado por trasplante

Variable	SSA		Voluven		<i>p</i> desc/lav	<i>p</i> tipo de lavado x desc/lav
	Descongelado	Lavado	Descongelado	Lavado		
CNT (x10 <sup>6</sup> )	46853,62 (±3675,25)	34465,41 (±3002,33)	52125,86 (±4737,30)	41282,32 (±3532,03)	<b>&lt;0,001</b>	0,346
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	309,68 (±25,30)	289,55 (±21,90)	319,65 (±47,92)	321,71 (±45,75)	0,187	0,106
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	45,49 (±3,63)	47,62 (±3,67)	48,27 (±6,38)	54,18 (±6,51)	<b>0,042</b>	0,339
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	43,05 (±4,54)	42,58 (±4,30)	96,23 (±9,98)	98,05 (±9,57)	0,796	0,662
Viabilidad	74,67 (±1,06)	75,40 (±1,03)	78,24 (±1,21)	78,62 (±1,19)	0,418	0,799

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Anova de medidas repetidas)

**Tabla 35.** Recuperación entre descongelado y lavado por trasplante

Variable	Tipo de lavado	
	SSA	Voluven
CNT (x10 <sup>6</sup> )	72,08 % (±1,38)	78,44 % (±1,39)
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	100,79 % (±3,01)	105,42 % (±2,95)
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	121,91 % (±6,73)	167,84 % (±30,19)
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	117,72 % (±8,92)	119,72 % (±9,10)
Viabilidad	101,94 % (±1,36)	100,96 % (±1,33)

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Análisis de la varianza)

## RESULTADOS

### **2.4. Estudio comparativo entre las variables en el momento final de aféresis (producto fresco) y el producto lavado**

Estudiamos los efectos del proceso global al que se someten los progenitores hematopoyéticos destinados al trasplante medular, comparando el momento de la aféresis con el momento previo a la infusión tras el lavado celular para la eliminación del crioprotector. El planteamiento del estudio es idéntico al mostrado en el apartado anterior.

Los resultados están expresados según la agregación de las variables, por bolsa, por proceso y por trasplante.

## RESULTADOS

### 2.4.1. Análisis por BOLSA

Los análisis realizados por bolsa, mostrados en la tabla 36, reflejan en el análisis total de la muestra, una pérdida significativa de CNT, de colonias, tanto CFU-GM como BFU-E, y de viabilidad en el intervalo estudiado desde la aféresis hasta el lavado de los PH. En el análisis por tipo de lavado de las variables anteriores, vemos que los dos tipos de lavado se comportan igual, excepto en la pérdida de CFU-GM, que es mayor en el caso del subgrupo lavado con SSA. Respecto al recuento de las células CD34<sup>+</sup> no observamos cambios significativos, ni en el estudio de la muestra total ni por subgrupos de tipo de lavado.

En la tabla 37 se muestran los porcentajes de recuperación de células o colonias correspondientes.

**Tabla 36.** Comparaciones entre aféresis y lavado por bolsa

Variable	SSA		Voluven		<i>p</i> afér/lav	<i>p</i> tipo de lavado x afér/lav
	Aféresis	Lavado	Aféresis	Lavado		
CNT (x10 <sup>6</sup> )	18717,04 (±695,51)	14448,37 (±330,08)	18227,20 (±405,63)	14368,98 (±364,11)	<b>&lt;0,001</b>	0,561
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	111,84 (±8,86)	121,34 (±9,44)	112,17 (±10,68)	111,95 (±12,05)	0,082	0,069
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	33,59 (±2,15)	19,94 (±1,62)	26,06 (±2,03)	18,70 (±1,58)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,011</b>
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	26,47 (±1,83)	17,86 (±1,37)	37,83 (±2,30)	33,86 (±2,52)	<b>&lt;0,001</b>	0,120
Viabilidad	91,30 (±0,63)	75,11 (±0,70)	92,66 (±0,80)	78,17 (±0,78)	<b>&lt;0,001</b>	0,187

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Anova de medidas repetidas)

"*p*" aféresis/lavados= comparación de la muestra global antes y después del lavado, partiendo de la aféresis.

"*p*" tipo de lavado x aféresis/lavado= comparación por subgrupos según tipo de solución de lavado, antes y después del lavado, partiendo de la aféresis.

**Tabla 37.** Recuperación entre aféresis y lavado por bolsa

Variable	Tipo de lavado	
	SSA	Voluven
CNT (x10 <sup>6</sup> )	84,20 % (±1,68)	79,23 % (±1,34)
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	111,04 % (±2,73)	103,62 % (±3,32)
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	75,34 % (±5,16)	103,52 % (±8,29)
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	126,21 % (±13,47)	131,36 % (±14,61)
Viabilidad	83,02 % (±0,88)	85,57 % (±1,49)

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Análisis de la varianza)

## RESULTADOS

### 2.4.2. Análisis por PROCESO

Los análisis realizados por proceso, mostrados en la tabla 38, reflejan en el análisis total de la muestra, una pérdida significativa de CNT, de colonias, tanto CFU-GM como BFU-E, y de viabilidad en el intervalo estudiado desde la aféresis hasta el lavado de los PH. En el análisis por tipo de lavado de las variables anteriores, no encontramos diferencias estadísticamente significativas. Respecto al recuento de las células CD34<sup>+</sup> no observamos cambios significativos, ni en el estudio de la muestra total ni por subgrupos de tipo de lavado.

En la tabla 39 se muestran los porcentajes de recuperación de células o colonias correspondientes.

**Tabla 38.** Comparaciones entre aféresis y lavado por proceso

Variable	SSA		Voluven		<i>p</i> afer/lav	<i>p</i> tipo de lavado x afer/lav
	Aféresis	Lavado	Aféresis	Lavado		
CNT (x10 <sup>6</sup> )	32970,80 (±2854,82)	25451,38 (±1483,00)	40954,86 (±2278,85)	32108,47 (±1971,61)	<b>&lt;0,001</b>	0,634
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	196,96 (±17,34)	213,82 (±18,79)	254,77 (±32,39)	250,25 (±37,89)	0,376	0,126
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	59,07 (±5,50)	35,17 (±2,94)	57,61 (±7,52)	41,96 (±5,39)	<b>&lt;0,001</b>	0,272
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	46,69 (±4,76)	31,45 (±3,13)	84,81 (±7,81)	75,99 (±7,56)	<b>0,004</b>	0,437
Viabilidad	90,98 (±0,80)	76,62 (±0,87)	93,46 (±1,04)	78,32 (±1,16)	<b>&lt;0,001</b>	0,653

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Anova de medidas repetidas)

**Tabla 39.** Recuperación entre aféresis y lavado por proceso

Variable	Tipo de lavado	
	SSA	Voluven
CNT (x10 <sup>6</sup> )	85,25 % (±2,43)	77,96 % (±1,83)
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	110,04 % (±3,55)	102,86 % (±4,62)
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	83,67 % (±6,32)	104,25 % (±11,59)
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	144,11 % (±18,76)	125,99 % (±17,82)
Viabilidad	84,92 % (±1,11)	84,97 % (±1,86)

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Análisis de la varianza)

## RESULTADOS

### 2.4.3. Análisis por TRASPLANTE

Los análisis realizados por trasplante, mostrados en la tabla 40, reflejan en el análisis total de la muestra, una pérdida significativa de CNT, de colonias, tanto CFU-GM como BFU-E, y de viabilidad en el intervalo estudiado desde la aféresis hasta el lavado de los PH. En el análisis por tipo de lavado de las variables anteriores, no encontramos diferencias estadísticamente significativas. Respecto al recuento de las células CD34<sup>+</sup> no observamos cambios significativos, ni en el estudio de la muestra total ni por subgrupos de tipo de lavado.

En la tabla 41 se muestran los porcentajes de recuperación de células o colonias correspondientes.

**Tabla 40.** Comparaciones entre aféresis y lavado por trasplante

Variable	SSA		Voluven		p afer/lav	p tipo de lavado x afer/lav
	Aféresis	Lavado	Aféresis	Lavado		
CNT (x10 <sup>6</sup> )	44647,96 (±4648,60)	34465,41 (±3002,33)	52656,25 (±4486,30)	41282,32 (±3532,03)	<b>&lt;0,001</b>	0,756
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	266,67 (±20,26)	289,55 (±21,90)	327,57 (±37,90)	321,71 (±45,75)	0,358	0,122
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	80,02 (±7,41)	47,62 (±3,67)	74,37 (±9,03)	54,18 (±6,51)	<b>&lt;0,001</b>	0,242
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	63,25 (±6,59)	42,58 (±4,30)	109,52 (±9,63)	98,05 (±9,57)	<b>0,005</b>	0,411
Viabilidad	90,78 (±0,94)	75,40 (±1,03)	92,73 (±1,29)	78,62 (±1,19)	<b>&lt;0,001</b>	0,521

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Anova de medidas repetidas)

**Tabla 41.** Recuperación entre aféresis y lavado por trasplante

Variable	Tipo de lavado	
	SSA	Voluven
CNT (x10 <sup>6</sup> )	82,27 % (±2,45)	78,14 % (±1,97)
CD34 (x10 <sup>6</sup> )	108,78 % (±3,65)	98,52 % (±3,80)
CFU-GM (x10 <sup>6</sup> )	78,36 % (±6,49)	97,14 % (±10,14)
BFU-E (x10 <sup>6</sup> )	133,20 % (±20,79)	111,51 % (±10,70)
Viabilidad	83,78 % (±1,32)	86,24 % (±2,18)

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Análisis de la varianza)

## RESULTADOS

### 2.5. Resumen de resultados del estudio del producto celular a lo largo del proceso

#### Efecto del paso del producto fresco (aféresis) al producto descongelado

- ⊕ *Análisis por bolsa:* pérdida significativa de CFU-GM, BFU-E, y viabilidad total ( $p < 0,001$ ), con una ganancia significativa de las células CD34<sup>+</sup> ( $p = 0,013$ ). El recuento de CNT no experimenta cambios significativos (gráfico 8).
- ⊕ *Análisis por proceso y por trasplante:* Las células CD34<sup>+</sup> no sufren cambios significativos. Resto igual que en el análisis por bolsa.

#### Efecto del lavado sobre los PH descongelados, partiendo del producto descongelado

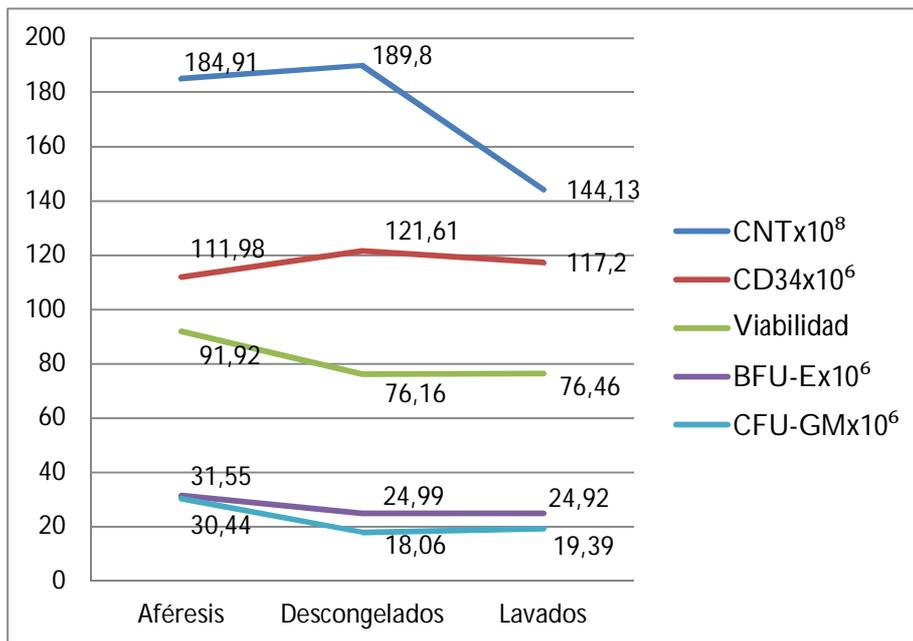
- ⊕ *Análisis por bolsa:* pérdida significativa de CNT ( $p < 0,001$ ) tras el lavado para el total de la muestra (gráfico 8), mayor para el subgrupo lavado con SSA ( $p < 0,001$ ) (gráfico 9 y 10). El resto de variables estudiadas no presenta cambios estadísticamente significativos tras el lavado (gráfico 8) y tampoco diferencias al comparar por tipo de lavado (gráfico 9 y 10).
- ⊕ *Análisis por proceso y por trasplante:* pérdida significativa de CNT ( $p < 0,001$ ) tras el lavado para el total de la muestra; en este caso sin diferencias significativas al comparar por tipo de lavado. Para el resto de variables analizadas, la única diferencia respecto al análisis por bolsa, es la ganancia significativa de CFU-GM ( $p = 0,035$ ) tras el lavado, sin diferencias al comparar por tipo de lavado.

#### Efecto del lavado sobre los PH descongelados, partiendo del producto fresco (aféresis)

- ⊕ *Análisis por bolsa:* pérdida significativa de CNT, de CFU-GM y BFU-E, y de viabilidad ( $p < 0,001$ ); siendo la pérdida de CFU-GM significativamente mayor en el caso del subgrupo lavado con SSA ( $p = 0,011$ ). Para el resto de variables la comparación por tipo de lavado no muestra diferencias estadísticamente significativas. Las células CD34<sup>+</sup> permanecen inalterables.
- ⊕ *Análisis por proceso y por trasplante:* resultados comparables a los obtenidos en el análisis por bolsa, con la única diferencia que en este caso, los dos tipos de lavados se comportan igual para todas las variables analizadas.

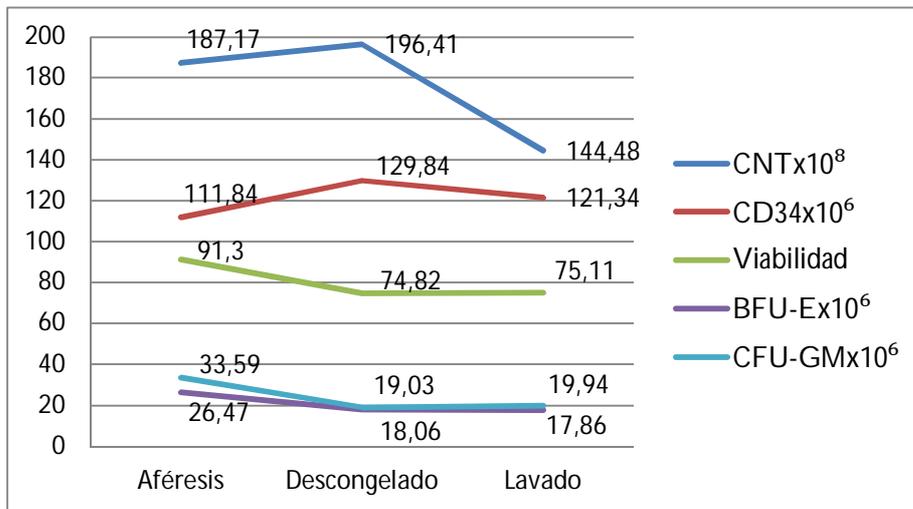
## RESULTADOS

**Gráfico 8.** Pérdidas celulares analizadas para el **total de la muestra**

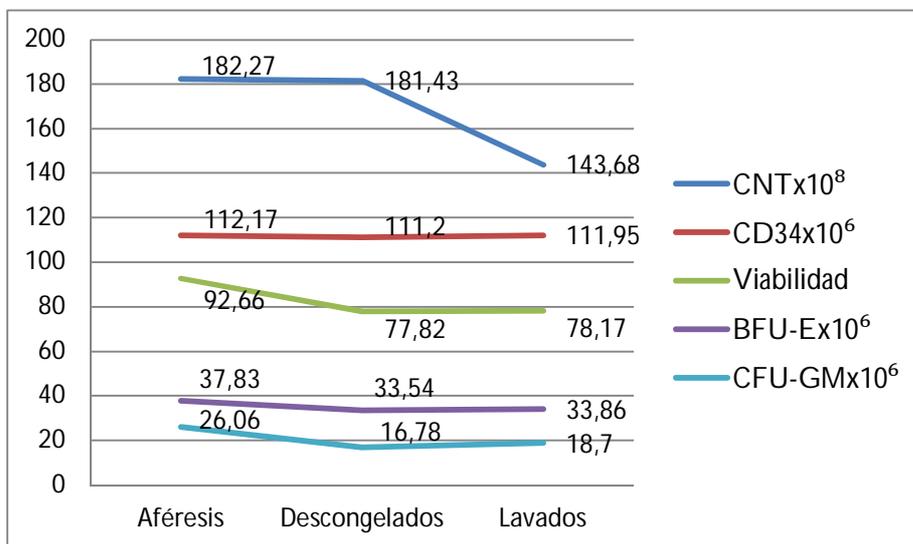


## RESULTADOS

**Gráfico 9.** Pérdidas celulares en el subgrupo lavado con **SSA**



**Gráfico 10.** Pérdidas celulares en el subgrupo lavado con **Voluven®**



## RESULTADOS

### 2.6. Estudio comparativo entre la tasa de contaminación bacteriana del producto de aféresis y el producto una vez lavado

Realizamos un estudio comparativo de la tasa de contaminación bacteriana con los resultados de los cultivos microbiológicos en las bolsas de recolección de aféresis y en las bolsas lavadas.

El planteamiento del estudio es idéntico al seguido en apartados anteriores.

Los resultados están expresados únicamente por bolsa, puesto que esta variable no podemos agregarla.

Observamos que en el análisis de la muestra total no hay diferencias significativas en la tasa de aislamientos microbiológicos en la comparativa realizada entre aféresis y lavados; sin embargo, en el análisis por tipo de lavado, la tasa de aislamientos microbiológicos decrece de forma significativa tras el lavado en el subgrupo lavado con Voluven® (tabla 42).

**Tabla 42.** Comparaciones entre aféresis y lavado por bolsa

Variable	SSA		Voluven		<i>p</i> afer/lavt	<i>p</i> tipo de lavado x afer/lav
	Aféresis	lavado	Aféresis	lavado		
Microbiología Positiva (Media±SEM)	0,06 (±0,015)	0,09 (±0,019)	0,07 (±0,018)	0,04 (±0,014)	0,887	0,008

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Análisis de la varianza de medidas repetidas)

"*p*" aferesis/lavados=comparación de la muestra global antes y después del lavado, partiendo del producto fresco en la aféresis

"*p*" tipo de lavado x aferesis/lavado= comparación de ambos subgrupos según la solución de lavado empleada antes y después del lavado, partiendo del producto fresco en la aféresis.

En las tablas mostradas a continuación, se detalla el tipo de bacterias aisladas por bolsa, en el momento de la aféresis y después del lavado, para cada subgrupo (tabla 43 grupo lavado con SSA y tabla 44 grupo lavado con Voluven®)

## RESULTADOS

**Tabla 43.** Relación de gérmenes bacterianos aislados en los cultivos de las bolsas antes y después del lavado, en el grupo lavado con SSA.

TPH	Nº bolsas contaminadas /bolsas lavadas	Aislamientos bolsas aféresis	Aislamientos bolsas lavadas
271	2/2 *	1. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1. <i>Staphylococcus epidermidis</i>
		2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>
270	2/7	1. <i>Staphylococcus hominis</i> 2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1. <i>Staphylococcus hominis</i> 2. <i>Staphylococcus hominis</i>
262	1/7	Negativo	<i>Staphylococcus warneii</i>
260	1/2	Negativo	BGN no fermentador
259	1/5	Negativo	<i>Staphylococcus warneii</i>
238	1/1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
234	1/1	<i>Streptococcus viridans</i>	Negativo
228	1/3	<i>Streptococcus sp</i>	Negativo
227	1/4	Negativo	<i>Streptococcus viridans</i>
226	1/1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negativo
296	4/4*	1. <i>Staphylococcus sp</i> 2. <i>Staphylococcus sp</i>	1. <i>Staphylococcus epidermidis</i> 2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>
		3. <i>Staphylococcus epidermidis</i> 4. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	3. <i>Staphylococcus epidermidis</i> 4. <i>Staphylococcus epidermidis</i>
303	1/1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negativo
325	3/7*	1. Negativo	1. <i>Staphylococcus haemolyticus</i>
		2. Negativo	2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>
		3. Negativo	3. <i>Staphylococcus epidermidis</i>
326	1/2	Negativo	<i>Corynebacterium spp</i>
374	3/7*	1. Negativo	1. <i>Salmonella group</i>
		2. Negativo	2. <i>Staphylococcus warneii</i>
		3. Negativo	3. <i>Staphylococcus epidermidis</i>

\*Las bolsas contaminadas pertenecen a distintos procesos de aféresis.

## RESULTADOS

**Tabla.44.** Relación de gérmenes bacterianos aislados en los cultivos de las bolsas antes y después del lavado, en el grupo lavado con Voluven®

Nº TPH	Nº bolsas contaminadas /bolsas lavadas	Aislamientos bolsas aféresis	Aislamientos bolsas lavadas
331	4/10	1. <i>Staphylococcus epidermidis</i> 2. <i>Staphylococcus epidermidis</i> 3. <i>Staphylococcus epidermidis</i> 4. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1. Negativo 2. Negativo 3. Negativo 4. <i>Staphylococcus epidermidis</i>
357	2/2	1. <i>Staphylococcus epidermidis</i> 2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1. Negativo 2. Negativo
399	4/4*	1. <i>Staphylococcus epidermidis</i> 2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1. <i>Staphylococcus epidermidis</i> 2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>
		3. <i>Staphylococcus epidermidis</i> 4. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	3. <i>Staphylococcus epidermidis</i> 4. <i>Staphylococcus epidermidis</i>
411	2/2	1. <i>Streptococcus mitis</i> 2. <i>Streptococcus mitis</i>	1. <i>Streptococcus sanguis</i> 2. Negativo

\*Las bolsas contaminadas pertenecen a distintos procesos de aféresis.

## RESULTADOS

### 3. Estudio del injerto

#### 3.1. Estudio de eficacia del procedimiento de lavado comparando las características del injerto en ambos subgrupos según la solución de lavado empleada

##### 3.1.1. Tiempos de injerto leucocitario y plaquetar

En la tabla 45, se muestran los resultados referentes a los tiempos de injerto comparando ambos subgrupos por tipo de solución de lavado empleada. No se encontraron diferencias significativas.

**Tabla 45.** Tiempos de injerto por tipos de lavado

Variable	Tipo de lavado		<i>p</i>
	SSA	Voluven	
Días Leucocitos	10,55 ( $\pm 0,16$ )	11,03 ( $\pm 0,29$ )	0,132
Días RAN	11,29 ( $\pm 0,34$ )	12,02 ( $\pm 0,38$ )	0,169
Días Plaquetas	13,19 ( $\pm 0,71$ )	14,77 ( $\pm 1,90$ )	0,376

Nota: Entre paréntesis  $\pm$  error estándar de la media. (Test t-Student para muestras independientes)

Todos los pacientes alcanzaron el injerto de leucocitos en un máximo de 21 días para el subgrupo lavado con SSA y de 22 días para el subgrupo lavado con Voluven®.

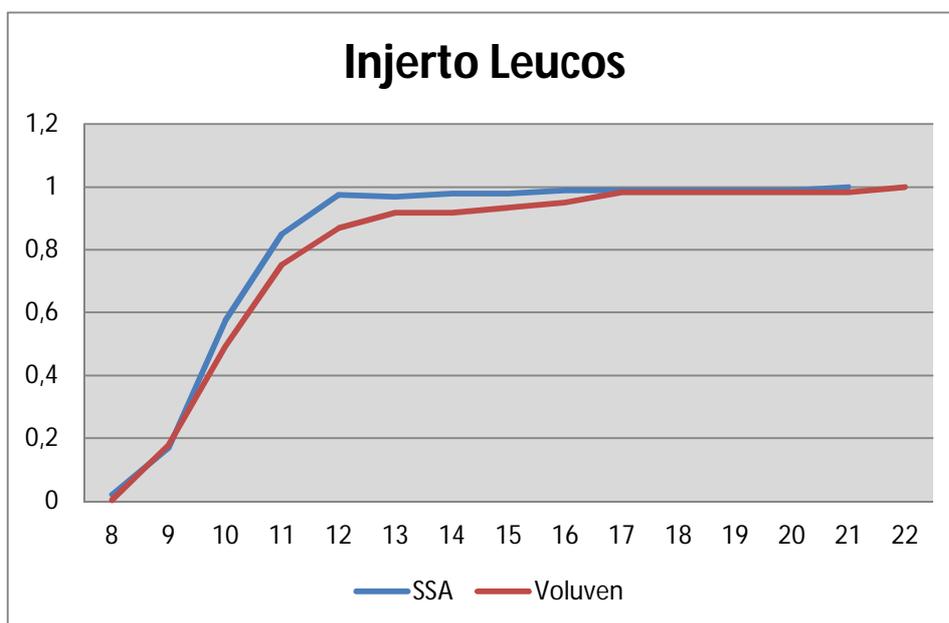
Todos los pacientes alcanzaron el injerto de RAN en un máximo de 34 días para el subgrupo lavado con SSA y de 27 días para el subgrupo lavado con Voluven®.

Para el injerto de plaquetas, el rango máximo por subgrupos fue de 113 días para un paciente del subgrupo lavado con Voluven® y de 50 días para un paciente del subgrupo lavado con SSA.

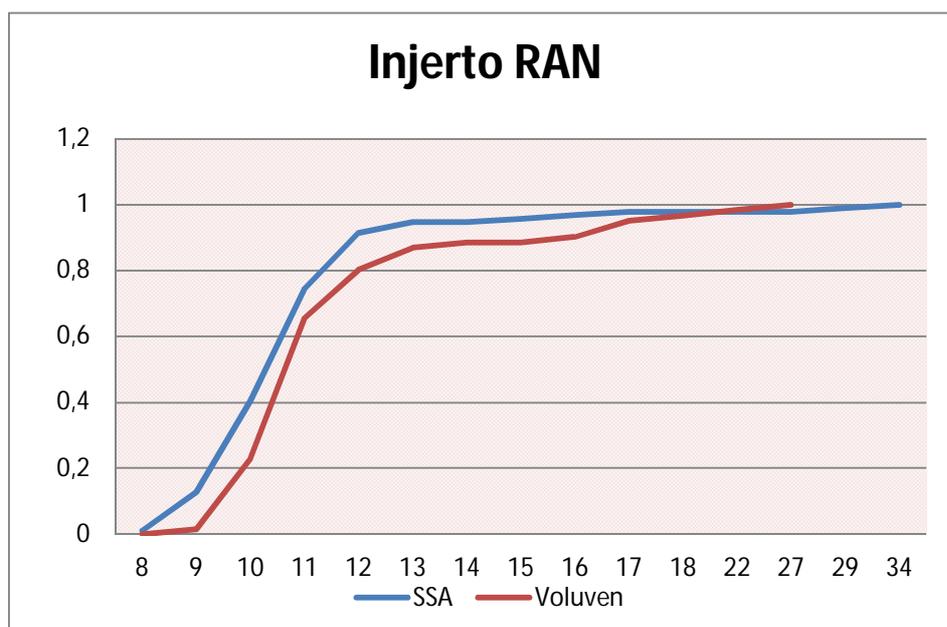
A continuación, están representadas las gráficas de cinética de injerto para leucocitos (gráfico 11), RAN (gráfico 12) y plaquetas (gráfico 13) para cada uno de los subgrupos por tipo de solución de lavado.

## RESULTADOS

**Gráfico 11.** Cinética de injerto de Leucocitos

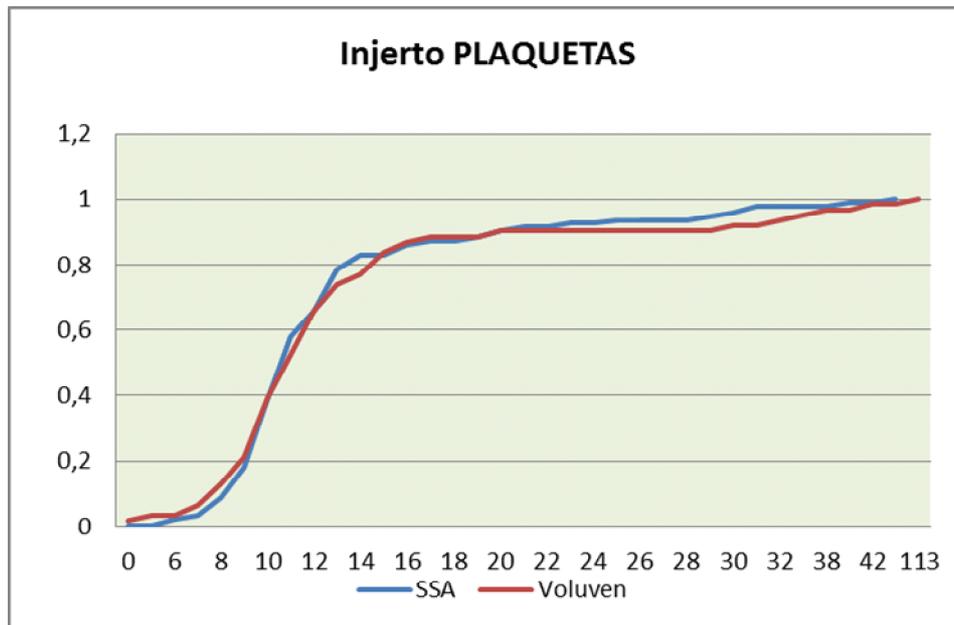


**Gráfico 12:** Cinética de injerto de RAN (recuento absoluto de neutrófilos)



## RESULTADOS

**Gráfico 13.** Cinética de injerto de plaquetas



### 3.1.2. Requerimientos transfusionales

En la tabla 46, se muestran los resultados referentes a los requerimientos transfusionales, comparando ambos subgrupos por tipo de solución de lavado empleada. No se encontraron diferencias significativas.

**Tabla 46.** Transfusiones requeridas por tipo de lavado

Variable $\pm$ SEM	Tipo de lavado		<i>p</i>
	SSA	Voluven	
Transfusiones CH	2,03 ( $\pm$ 0,34)	2,15 ( $\pm$ 0,42)	0,833
Transfusiones PLQ	2,62 ( $\pm$ 0,24)	2,51 ( $\pm$ 0,33)	0,789

Nota: Entre paréntesis  $\pm$  error estándar de la media (test t-Student para muestras independientes)

## RESULTADOS

### 4. Estudio de seguridad

#### 4.1. Estudio de seguridad del procedimiento de lavado, según la solución empleada

##### 4.1.1. Tasa de aislamientos microbiológicos en los pacientes

En este apartado consideramos los aislamientos microbiológicos bacterianos recogidos de muestras del paciente en sangre, orina y heces.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, tal y como se muestra en la tabla 47.

**Tabla 47.** Aislamientos microbiológicos en pacientes por tipo de lavado (test Chi-cuadrado)

Variable		Tipo de lavado		<i>p</i>
Aislamientos microbiológicos		SSA	Voluven	0,270
	Positivos Número (%)	18 (19,1)	15 (24,6)	
	Negativos Número (%)	76 (80,9)	46 (75,4)	

(Test Chi-cuadrado)

En la tabla que viene a continuación (tabla 48) se detalla el tipo o tipos de bacterias aisladas en las muestras de los pacientes, según pertenezcan a un subgrupo u otro.

## RESULTADOS

**Tabla 48.** Relación de gérmenes bacterianos aislados en los cultivos de las muestras tomadas a los pacientes trasplantados.

Nº TPH	TPH lavados con SSA	Nº TPH	TPH lavados con Voluven
267	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	406	<i>klebsiella pneumonia</i> (sepsis) <i>Clostridium difficile</i>
286	<i>Enterococcus faecium</i>	345	Toxina <i>Clostridium difficile</i>
314	<i>Enterococcus faecium</i>	360	<i>Campylobacter jejuni</i>
322	<i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Staphylococcus hominis</i>	363	<i>Enterococcus faecium</i>
374	Toxina <i>Clostridium difficile</i>	366	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
298	<i>Streptococcus sp</i>	327	<i>Enterococcus faecium</i>
300	<i>Salmonella enteritidis</i>	376	<i>klebsiella BLEA</i>
306	<i>Staphylococcus hominis</i>	337	<i>Staphylococcus hominis</i>
076	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	344	<i>Staphylococcus hominis</i>
241	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	373	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
290	<i>Enterococcus faecium</i> y <i>Campylobacter jejuni</i>	397	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Escherichia coli</i>
291	<i>Staphylococcus hominis</i>	398	<i>Escherichia coli</i>
278	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	340	<i>Enterococcus faecium</i>
271	<i>Enterococo faecium</i>	353	<i>Escherichia coli</i> (urocultivo) <i>Proteus mirabilis</i> (urocultivo)
238	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	356	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>klebsiella pneumoniae</i>
289	<i>Enterococcus faecium</i>		
280	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Corynebacterium</i>		
074	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>		

## RESULTADOS

### 4.1.2. Días de fiebre y días de hospitalización

En ambos casos hemos contando a partir del día de la infusión (día 0).

En la tabla 49 se muestran los resultados de dicho análisis. No se encontraron diferencias significativas entre ambos subgrupos.

**Tabla 49.** Días de fiebre y de hospitalización por subgrupos

Variable	Tipo de lavado		<i>p</i>
	SSA	Voluven	
Días fiebre	1,58 ( $\pm 0,26$ )	1,97 ( $\pm 0,41$ )	0,410
Días hospitalización	18,07 ( $\pm 0,92$ )	17,51 ( $\pm 1,14$ )	0,701

Nota: Entre paréntesis  $\pm$  error estándar de la media (test t-Student para muestras independientes)

### 4.1.3. Reacciones adversas de la infusión

Únicamente observamos cuatro eventos adversos en tres pacientes. Todos pertenecían al subgrupo que recibieron progenitores hematopoyéticos lavados con Voluven®. No registramos ningún evento en el grupo lavado con SSA.

Las reacciones adversas fueron las siguientes:

- Una paciente de 48 años diagnosticada de un Linfoma difuso de células grandes B y con historia previa de encefalitis viral, sufrió una crisis epiléptica claramente relacionada con la velocidad de infusión. Esta misma paciente presentó náuseas/vómitos grado 2. Es de reseñar que esta paciente precisó un segundo trasplante y no presentó ninguna reacción infusional en esa ocasión.
- Otra paciente de 52 años y también diagnosticada de un Linfoma difuso de células grandes B sufrió náuseas grado 1 autolimitadas.
- Un paciente de 47 años diagnosticado de una Amiloidosis primaria presentó un cuadro de hipotensión arterial transitorio.

## RESULTADOS

### 4.1.4. Cifras de creatinina basal y en el momento del alta hospitalaria

Se contrastaron en ambos subgrupos, según el tipo de lavado, los datos referentes a las cifras de creatinina en el momento previo a la infusión (creatinina basal) y en el momento del alta (creatinina al alta), considerando el daño potencial que puede ejercer el Voluven® sobre el riñón en los pacientes críticos.

Los resultados expuestos en la tabla 50, muestran que cuando comparamos las cifras de creatinina basales con las cifras en el momento del alta para el total de la muestra, existe un descenso de las cifras de creatinina estadísticamente significativo, no existiendo diferencias significativas entre ambos subgrupos por tipo de lavado.

**Tabla 50.** Comparación de las cifras de creatinina basales y al alta

Variable	SSA		Voluven		<i>p</i> basal/alta	<i>p</i> tipo de lavado x basal/alta
	Basal	Al alta	Basal	Al alta		
Creatinina mg/dL	1,12 (±0,12)	0,96 (±0,10)	0,84 (±0,06)	0,64 (±0,06)	<b>0,001</b>	0,751

Nota: Entre paréntesis ± error estándar de la media (Análisis de la varianza de medidas repetidas)

DISCUSIÓN

**DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

La evolución del trasplante autólogo ha sido posible gracias al desarrollo de los métodos de criopreservación, que permiten conservar la viabilidad del tejido hematopoyético medular durante largo tiempo (258,259).

El trasplante de sangre periférica se inició en 1962, con la demostración de la existencia de progenitores hematopoyéticos en la sangre de ratones por Goodman y Hodgson (260). Fue en la década de los 80 cuando se uso se generalizó como fuente de progenitores hematopoyéticos para trasplante (261).

Hoy en día el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica constituye un procedimiento terapéutico ampliamente utilizado, con indicaciones sólidamente establecidas y otras en proceso de evaluación experimental.

La infusión directa de productos celulares descongelados se ha relacionado con la aparición de reacciones adversas muy variadas, desde síntomas leves como náuseas y vómitos, hipotensión/hipertensión, calambres abdominales, diarrea, sofocos y escalofríos, hasta síntomas de riesgo vital como arritmias cardíacas, encefalopatía, fallo renal agudo y depresión respiratoria (5,152,156,159,160,168,173,175,177,182,262). Estas reacciones adversas se han atribuido en algunos casos a la presencia de DMSO (175,178,179,182) y en otros casos se ha postulado la participación de factores adicionales como la lisis de hematíes (262,263) o la infusión de un alto número de granulocitos dañados durante la criopreservación (159,160,264,265). Para evitar la aparición de estas reacciones adversas relacionadas con la infusión, muchas instituciones han optado por limitar la cantidad total de DMSO que se puede infundir de una sola vez. Otras, entre las que se incluye nuestro grupo, han optado por evaluar protocolos de lavado para eliminar el DMSO y detritus orgánicos.

Los factores que pueden contribuir a las reacciones adversas tras la infusión son muchos. Pero además, los mecanismos biológicos por los cuales suceden son complejos y no son conocidos completamente. Entre ellos, y como los más probables, se incluyen: el propio DMSO contenido en las células criopreservadas (163,166,200), la presencia de agregados celulares y restos de células muertas tras la descongelación (176), lisis de eritrocitos con liberación de hemoglobina, electrolitos y fragmentos de membrana (200), la concentración de células nucleadas totales y el volumen de la suspensión (152,159,160), la baja temperatura de los productos infundidos (200), el desequilibrio electrolítico (175,200), y la premedicación previa a la infusión (corticoides, diuréticos, antihistamínicos y antieméticos) usada para

## DISCUSIÓN

neutralizar el efecto de la liberación de histamina provocada por el DMSO, pero que puede originar bradicardia (160,200). Otros factores propios del paciente como la edad, el peso, el sexo y alguna enfermedad específica pueden contribuir a la aparición de reacciones adversas. Por ejemplo, las mujeres jóvenes tienen mayor riesgo de padecerlas que los varones mayores. También se observan más reacciones adversas en pacientes con linfoma de Hodgkin que en pacientes con linfoma no-Hodgkin o Mieloma múltiple (160). Finalmente, también pueden influir en su aparición los tratamientos citostáticos previos (163) o fenómenos relacionados con el propio proceso de la infusión, como pueden ser la velocidad de la infusión y el tiempo que transcurre entre la descongelación y la infusión.

Por otro lado, diversos estudios indican que la exposición prolongada al DMSO puede afectar a la funcionalidad de los progenitores hematopoyéticos, influyendo en la capacidad de injerto; aunque probablemente las frías temperaturas y la exposición a corto plazo, minimizan cualquier impacto nocivo. En esta línea algunos estudios han demostrado que la exposición prolongada al DMSO puede tener un impacto directo sobre la función celular y su crecimiento, interfiriendo en su metabolismo, actividad enzimática, ciclo celular y apoptosis (266). Se postula también que puede afectar a la concentración de calcio intracelular (267). El DMSO puede inducir o inhibir la apoptosis y la diferenciación medular, dependiendo del tipo de célula, del estado de desarrollo o diferenciación celular, de la concentración y del tiempo de exposición al DMSO (266,268,269). Una concentración de DMSO al 10% es hiperosmótica (2500-3000 mOsm), por lo que la infusión rápida de PH criopreservados en el torrente sanguíneo del receptor (isosmótico) podría causar una hiperhidratación celular y un daño osmótico que conduciría a la muerte celular (270,271), pudiendo afectar al injerto.

La infusión de DMSO puede inducir la liberación de histamina y puede afectar al eje cortico límbico-hipotalámico causando vómitos, náuseas, diarrea, dolor de cabeza, sudoración, escalofríos, disnea, anafilaxis, vasodilatación e hipotensión, molestias abdominales o pulmonares, etc. (5,7,154,158,159,189,200). Se han descrito reacciones adversas neurotóxicas como dosis dependientes de DMSO (153,159,167,168). De manera similar el DMSO puede causar disfunciones renales y hepáticas y complicaciones cardiovasculares tras el trasplante (155,175). Donmez et al. (160) demostraron que el contenido de DMSO fue significativamente más alto en pacientes con reacciones adversas y también más alto en pacientes con complicaciones cardíacas, comparado con efectos adversos de otra índole. En muchos estudios se ha demostrado que los efectos adversos

## DISCUSIÓN

relacionados con el DMSO son dosis dependientes y pueden acumularse en casos de múltiples terapias celulares (7,154,157,159,176,272). En pacientes pediátricos los efectos adversos son más severos (7), quizás debido al menor peso. Junior et al. (153) recomiendan que la dosis máxima de DMSO infundida debiera ser ajustada al peso (1 g DMSO por Kg de peso).

En nuestra serie, donde el total de pacientes (n=158) reciben progenitores hematopoyéticos lavados, únicamente observamos 4 reacciones adversas en 3 pacientes (1,6%), todos ellos pertenecientes al subgrupo lavado con Voluven®. Este dato contrasta con el 26,4% de reacciones infusionales, observadas en el grupo control no sometido a lavado de PH, que publicó nuestro grupo en 2012 (11). Las reacciones adversas descritas en nuestra serie actual han sido: náuseas grado 1, náuseas/vómitos grado 2, hipotensión y una crisis epiléptica relacionada con el ritmo de infusión en una paciente con historia previa de encefalitis viral. Todos eran pacientes con menos de 65 años (47, 48 y 52 años). Dos de ellos eran mujeres, ambas con el diagnóstico de un Linfoma difuso de células grandes B, y un varón con el diagnóstico de Amiloidosis primaria. Dado que no disponemos de la cuantificación de DMSO residual en el producto lavado, no podemos descartar con seguridad que los efectos adversos descritos pudieran estar en relación con éste u otros factores. Pero una observación importante es que los tres pacientes que presentaron reacciones adversas recibieron una dosis de CNT que prácticamente doblaba a la media recibida por su grupo ( $9,07 \times 10^8/\text{kg}$ ,  $10,29 \times 10^8/\text{kg}$  y  $10,46 \times 10^8/\text{kg}$  respectivamente frente a la media de  $5,76 \times 10^8/\text{kg}$  CNT); por otra parte estos pacientes también recibieron la infusión de prácticamente el doble de bolsas que la media infundida (5, 4 y 4 bolsas respectivamente frente a la media de 2,71 bolsas infundidas).

**Foïs et al.** (152) comunicaron un mayor número de efectos adversos cuando se infundían un alto número de células y recomendaban en estos casos, que al menos se preparasen dos alícuotas y se infundieran por separado. También observaron más reacciones infusionales cuando las bolsas contenían agregados tras la descongelación, a pesar de utilizar filtros de 170- $\mu\text{m}$  durante la infusión. Estas bolsas con agregados mostraban una tendencia a tener una mayor concentración celular, aunque no llegaba a alcanzar significación estadística. Los autores se cuestionan si estos agregados celulares podrían inducir la liberación de citoquinas, que podrían ser las responsables de los efectos sistémicos en los pacientes durante la infusión.

## DISCUSIÓN

Además de las reacciones infusionales, otros factores que hemos tenidos en cuenta a la hora de valorar la seguridad del procedimiento en el paciente, fueron:

- Los **días de fiebre y los días de hospitalización**, sin encontrar diferencias significativas al comparar ambos subgrupos. La media de días de fiebre fue 1,58 y 1,97 para SSA y Voluven® respectivamente. Y la media de días de hospitalización fue de 18,07 y 17,51 para SSA y Voluven® respectivamente. En el estudio publicado en 2012 por nuestro equipo (273), apreciamos una media de días fiebre de 3,23 días en los TPH del grupo no sometido a lavado de PH, y de 1,43 días en los TPH del grupo lavado ( $p=0,0002$ ). Respecto a los días de hospitalización obtuvimos una media de 16,86 días en los TPH del grupo no lavado, y de 17,26 días en los TPH del grupo lavado ( $p=0,737$ ). Siendo los resultados en el grupo de TPH libre de DMSO, comparables a los de la serie actual.
- El **riesgo de insuficiencia renal**, analizado teniendo en cuenta el daño potencial que puede ejercer el Voluven® sobre el riñón en el caso de pacientes críticos, tal como lo hizo constar una alerta publicada por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) el 14 de Junio de 2013. Esta alerta recomendaba suspender el uso en pacientes críticos de soluciones que contuvieran hidroxietil almidón, basándose en datos recientes que mostraban que en pacientes adultos críticos las soluciones de HES incrementan el riesgo de muerte y de insuficiencia renal grave. La revisión fue realizada por la agencia de medicamentos de Alemania (274), el Instituto Federal de Medicamentos y Productos Sanitarios (BfArM), tras tres recientes estudios (275–277) donde HES se comparó con cristaloides para la reposición de volumen en pacientes en estado crítico. Los estudios mostraron que los pacientes con sepsis grave tratados con HES tenían un riesgo aumentado de lesión renal con requerimiento de diálisis.

Para dicho análisis comparamos las cifras de creatinina basal (antes de la infusión) con las cifras de creatinina en el momento del alta. Primero lo hicimos para el total de la muestra, observando un descenso de las cifras de creatinina estadísticamente significativo. En segundo lugar, realizamos el análisis por tipo de lavado, sin obtener diferencias estadísticamente significativas. La media de creatinina basal fue 1,12 mg/dL y 0,96 mg/dL al alta en el subgrupo lavado con SSA. Para el subgrupo lavado con Voluven® la media de creatinina basal fue 0,84 mg/dL y 0,64

## DISCUSIÓN

mg/dL al alta. Todos los pacientes con insuficiencia renal crónica (total 7) eran pacientes diagnosticados de un Mieloma Múltiple, tres de ellos en hemodiálisis desde antes del trasplante. Ningún paciente precisó iniciar programa de diálisis tras la infusión.

- **La tasa de aislamientos bacteriológicos en pacientes.** Los gérmenes aislados más frecuentemente fueron: *Enterococcus facium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* y *Escherichia coli*, por ese orden. No encontramos diferencias significativas en el análisis por tipo de lavado cuando analizamos la tasa de aislamientos microbiológicos. El porcentaje de aislamientos positivos fue del 19,1% en el grupo SSA y del 24,6% en el grupo de Voluven®. Cuando contrastamos nuestros datos con los publicados anteriormente por nuestro equipo (273), observamos que los resultados actuales muestran una tasa de aislamientos microbiológicos discretamente más alta respecto a los TPH del grupo sometido a lavado (un 18,75% frente a un 24,6%). Debemos tener en cuenta, que entonces solo se contabilizaron los cultivos de los pacientes que presentaron fiebre y por otro lado, se incluyeron en el recuento a las reactivaciones virales. En el grupo no lavado obtuvieron una tasa de aislamientos microbiológicos del 25%.

Cuando contrastamos los datos de los cultivos positivos en especímenes de pacientes con los aislamientos bacteriológicos en las bolsas de PH lavadas, encontramos que tres pacientes con cultivos positivos recibieron bolsas de PH contaminadas. Sin embargo, en ninguno de los casos el patógeno aislado fue el mismo.

Dado que es difícil confirmar si la patogénesis de las complicaciones es sólo por la infusión del DMSO o por otros múltiples factores descritos anteriormente, aún existe debate sobre los beneficios de eliminar el DMSO antes de la transfusión. El grupo de Córdoba et al. (159) demostró la presencia de reacciones adversas pese a la eliminación del DMSO y el bloqueo adecuado de la histamina, sugiriendo que otros factores como el número de granulocitos podían tener más peso que el contenido de DMSO. Aunque son muchos los investigadores que están a favor de la eliminación del DMSO (10,152,154,157,158,160,163,175,177,189,197,200,202,278), la falta de consenso ha

## DISCUSIÓN

provocado que las agencias reguladoras no dictaminen normas específicas en cuanto a la eliminación del DMSO, dejando la toma de decisiones en manos de médicos e instituciones clínicas. La pregunta fundamental que nos planteamos es: ¿cómo podemos evitar la toxicidad del DMSO sin que ello afecte cuantitativamente ni cualitativamente al inóculo?

Las estrategias aplicadas para prevenir los efectos adversos relacionados con la infusión son múltiples. Desde prácticas de uso generalizado, como la administración de premedicación antes de la infusión (158,197) y la disminución de la velocidad de infusión (158,159,197), a otras técnicas más concretas como las descritas a continuación:

- a. **Fraccionamiento en múltiples alícuotas** infundidas con horas o días de intervalo (152,153,158,272). Poco operativo en la práctica diaria.
- b. **Criopreservación a altas concentraciones**, permitiendo una reducción de volumen y, en consecuencia, una reducción del contenido de DMSO (124,193,194,196,279–281). Rowley et al. establecieron que las concentraciones celulares altas en el producto criopreservado (hasta  $560 \times 10^6$  células/mL) son bien toleradas, sin asociarse con efectos adversos significativos y con buenos resultados clínicos (115). Se encontraron resultados similares en estudios posteriores de Kawano et al. (282) y Cabezado et al. (124). Para la práctica clínica una concentración celular de  $200 \times 10^6$  células/mL se muestra asequible (115,283,284). En nuestra serie la concentración celular máxima permitida se estableció en  $150 \times 10^6$ /mL.
- c. **Concentraciones de DMSO <10%** o su uso en combinación con otros crioprotectores. El crioprotector estándar es el DMSO que por lo general se usa a concentraciones del 10%, combinado con solución salina y albúmina sérica (145,285–287), escogido por su seguridad y por no ser tóxico para las células progenitoras (145). Sin embargo, la infusión de DMSO se asocia con la presencia de múltiples reacciones adversas. Simplemente con la reducción del DMSO a un 5%, puede disminuir su toxicidad, reducirse la liberación de componentes intracelulares procedentes de células muertas (288) y mejorar la cinética de injerto (191). Por debajo del 5% de DMSO la recuperación celular se podría ver afectada, por lo que se recomienda su combinación con otros agentes crioprotectores como por ejemplo: 6% hidroxietil almidón + 5% DMSO tal y como describen Keung y Rowley (148,191).

## DISCUSIÓN

Constituyen métodos de conservación alternativos para la criopreservación, el propilenglicol (una combinación de alfa tocoferol, catalasa, y ácido ascórbico) y la trehalosa, como crioprotector intra y extracelular (289–291). En los últimos 20 años la trehalosa captó gran interés gracias a sus propiedades únicas. Tiene una temperatura de transición vítrea alta y es muy efectiva formando un frágil estado vítreo que sirve de protección a las células durante la congelación/descongelación y secado, manteniendo así la estabilidad termodinámica de las membranas celulares e inhibiendo la transición de la fase lipídica (292–294). Pero el DMSO sigue siendo el crioprotector más utilizado para la crioprotección de los progenitores hematopoyéticos en la actualidad.

Existen datos preclínicos interesantes que demuestran que el proceso de congelación-descongelación se asocia con la activación de las caspasas, lo que sugiere que la apoptosis juega un papel importante en la criolesión de los injertos trasplantados. Demostrando que la adición del inhibidor de caspasa zVAD-fmk, tanto si se añade a la solución de congelación como al medio de cultivo tras la descongelación, mejora en gran medida la recuperación y supervivencia de las células criopreservadas, lo cual representa una intrigante perspectiva de futuro (295).

Pero cualquiera de las técnicas citadas anteriormente, solo consigue una reducción limitada del crioprotector y de los restos celulares derivados de la lisis celular postdescongelación.

- **Lavado de los progenitores hematopoyéticos** para la eliminación del DMSO. El protocolo de lavado estándar actual se basa en el protocolo “New York Blood Center” (4). El proceso de lavado para la eliminación del DMSO tras la descongelación de los PH, ya sea de sangre periférica, médula ósea o sangre de cordón umbilical, puede considerarse aún como modelo en el que se asume que el DMSO tiene un efecto tóxico sobre los PH descongelados (4,290). Sin embargo, existen estudios posteriores que cuestionan este punto, sugiriendo la resistencia de las células progenitoras a la exposición del DMSO (145,287). De cualquier modo, su eliminación del inóculo reduce la toxicidad sobre el receptor, ya que el grado de toxicidad del DMSO es proporcional a su concentración (296). Incluso se sugirió que la eliminación del DMSO podía mejorar el injerto (297), aunque no parece que haya datos convincentes (164). Se ha comprobado que este procedimiento es seguro y se

## DISCUSIÓN

asocia con una recuperación razonable de CNT y de células CD 34<sup>+</sup> (199). El método manual de centrifugación descrito por Rubinstein et al. en el año 1995 (4) ha sido el más ampliamente utilizado por su alta disponibilidad (162,173,197,200,202). En su contra tiene que es proceso muy laborioso, que puede producir agregados celulares con pérdidas de progenitores hematopoyéticos, activación celular y riesgo de contaminación bacteriana del producto (298,299). Por esta razón en los últimos años se han introducido nuevos dispositivos de lavado automático de células con buenos resultados (146,179,200,202).

Otra hipotética ventaja del lavado de los progenitores hematopoyéticos para la eliminación del DMSO es el efecto sobre el choque osmótico en el momento de la entrada en el torrente circulatorio, al disminuir la hiperosmolaridad del producto tras la eliminación del DMSO y, consecuentemente, amortiguando el choque osmótico. Rodríguez L et al. demostraron experimentalmente que el estado de las células descongeladas, tras someterlas a una dilución directa en medio isotónico, mejoró significativamente mediante la aplicación de una etapa de equilibrio osmótico previa de 5 minutos a 4°C en un medio hiperosmolar de Dextrano 40-Albúmina. Lo que sugiere que la estabilidad osmótica de los productos hematopoyéticos tras la descongelación podría resultar en una menor pérdida de progenitores, al evitar el cambio brusco de osmolaridad a su llegada al torrente circulatorio y, potencialmente, ocasionar una mejora en los resultados clínicos de recuperación hematológica (111). Rubinstein también experimentó con la dilución al 1/20 en plasma autólogo de muestras de SCU descongeladas, comunicando una disminución de la viabilidad del 20%-30% (4).

Finalmente, la eliminación del crioprotector en productos hematopoyéticos es beneficiosa para la conservación ex vivo del injerto a medio-largo plazo. Rodríguez L et al. demostraron que la presencia de DMSO redujo el recuento celular (50%), la capacidad clonogénica (60%) y la viabilidad de las células CD34<sup>+</sup> en el plazo de una a dos horas postdescongelación, incluso conservando las muestras a 4°C (111).

Nuestro grupo desde el año 2008, con el propósito principal de reducir los efectos adversos asociados a la infusión, fundamentalmente en la población pediátrica, optó por aplicar una técnica de lavado para la eliminación del DMSO, utilizando un el sistema automático y cerrado de lavado, Sepax®.

## DISCUSIÓN

Son muchos los métodos y aparatos que se han aplicado para eliminar el DMSO de los productos criopreservados. Por otra parte, se han evaluado para la eliminación del crioprotector aparatos desarrollados comercialmente para otros usos, como el ya descatalogado Cytomate® (200,201,300), el Sepax® (202,203) y la Cobe® 2991 (152,199). Los dos últimos funcionan por medio de centrifugación y el Cytomate por filtrado a través de una membrana rotatoria. Todos ellos tienen a favor que son procesos automáticos y menos laboriosos, con bajo riesgo de contaminación bacteriana. En su contra tienen el alto costo y la potencial pérdida celular debido a la centrifugación y eliminación del sobrenadante que puede contener células, además de la formación de agregados celulares y el daño osmótico ejercido por la solución de lavado. Recientemente se han desarrollado experimentalmente para la eliminación del DMSO nuevas tecnologías y métodos, sin el uso de la centrifugación. Por ejemplo un dispositivo de microfluidos investigado por Fleming et al. para muestras pequeñas (301,302) que a través de la difusión elimina el DMSO de las suspensiones celulares. Ding et al. (303) propusieron un efectivo método de diálisis para la eliminación del DMSO usando módulos de fibra hueca con membranas semipermeables. Zhou et al. (304) han desarrollado un nuevo método y sistema de dilución-filtración que puede ser usado para controlar con precisión el proceso para reducir la concentración del crioprotector y prevenir el daño osmótico celular. Los datos de la investigación sugieren que este método puede ser una estrategia rápida, segura, fácil de manejar, automática y asequible con menos pérdida celular y menor riesgo de contaminación.

A continuación y partiendo de nuestra hipótesis de trabajo, demostrar la eficacia y seguridad del lavado de PHSP para la eliminación del DMSO, comparando dos soluciones de lavado distintas (SSA vs Voluven®) utilizando la Sepax® como instrumento de lavado, contrastamos nuestros resultados con los publicados por otros investigadores. Para ello seguimos el orden mostrado en el apartado de resultados.

### • **Efecto de la congelación/descongelación sobre los PH criopreservados**

Cuando realizamos el análisis por bolsa encontramos una pérdida significativa de CFU-GM y BFU-E, y de la viabilidad total ( $p < 0,001$ ), con una ganancia significativa de las células CD34<sup>+</sup> ( $p = 0,013$ ). El recuento de CNT no experimenta cambios significativos.

## DISCUSIÓN

En el análisis agregado por proceso y por trasplante obtenemos los mismos resultados, salvo que no encontramos cambios significativos en el recuento de CD34<sup>+</sup>. Por lo tanto, es preciso interpretar con cautela el resultado obtenido en el análisis por bolsa, ya que podría estar influido por la suposición inicial de que las células están distribuidas equitativamente en las bolsas congeladas.

**R.Reich-Slotky et al.** (Vox Sanguinis 2008) (305), estudian el efecto de la congelación en los PHSP tras la descongelación, con los siguientes resultados:

- *Muestra:* 45 movilizaciones de donantes alogénicos (2) y autólogos (43): hemopatías malignas (35) y enfermedades malignas no hematológicas (8).
- *Tipo de TPH:* SP.
- *Crioprotector:* 7,5% DMSO.
- *Resultados:*

Viabilidad: medida por azul de tripano o 7-AAD fue 74% y 57% respectivamente, descenso debido mayormente a la pérdida de granulocitos.

CD34<sup>+</sup>: recuperación del 86,4 ± 17,4% en el producto descongelado.

- *Comentario:* Los datos de su estudio coinciden con los nuestros al obtener una alta recuperación de las células CD34<sup>+</sup> sometidas a criopreservación y una pérdida de viabilidad total tras la congelación. Reich-Slotky et al. (305) publicaron que las células CD34<sup>+</sup> son más resistentes a los daños producidos por la criopreservación, como son el choque osmótico y la formación de cristales de hielo, debido a la diferente composición de la membrana celular y a un mayor volumen osmótico inactivo.

### • Efecto del lavado sobre los PH descongelados

Comparamos los datos en el momento de la descongelación con los de las células lavadas. Cuando realizamos el análisis por bolsa, encontramos una pérdida significativa de CNT ( $p < 0,001$ ) para el total de la muestra. Esta pérdida es mayor en el subgrupo lavado con SSA ( $p < 0,001$ ). La recuperación de CNT fue del 75% en el subgrupo lavado con SSA y del 79% en el lavado con Voluven. No encontramos cambios estadísticamente significativos en el resto de variables estudiadas (CD34<sup>+</sup>, CFU-GM, BFU-E y viabilidad), tampoco al comparar entre sí ambos tipos de lavado.

## DISCUSIÓN

Cuando realizamos el análisis agregado por proceso y por trasplante, los resultados obtenidos coinciden en demostrar una pérdida significativa de CNT ( $p < 0,001$ ) tras el lavado para el total de la muestra; sin encontrar en este caso, diferencias significativas al comparar por tipo de lavado. Por otra parte, difieren de los anteriores en que muestran una ganancia significativa de colonias CFU-GM ( $p = 0,035$ ) tras el lavado, sin llegar a los valores precongelación y sin diferencias al comparar por tipo de lavado. Para el resto de variables los resultados no varían.

En este apartado, donde comparamos productos descongelados con productos lavados, consideramos que el análisis más exacto es el realizado por bolsa, puesto que tiene mayor número de observaciones (411 bolsas frente a 211 procesos de aféresis y 158 trasplantes) y todas ellas cuentan con recuentos realizados directamente sobre la unidad analizada, sin tener que calcular ninguna de las variables.

**Syme et al.** (ASBMT 2004) (157) analizan un método manual de lavado de PHSP comparando con los recuentos del producto descongelado:

➤ *Muestra:* 35 pacientes con cáncer de mama sometidos a TPH lavados frente a 21 TPH sin lavar.

➤ *Tipo de TPH:* SP.

➤ *Crioprotector:* 10% DMSO.

➤ *Método de lavado:* manual.

➤ *Solución de lavado:* 1000 ml salino (0.9% ClNa), 60 mL de ACD-A.

➤ *Resultados:*

CNT: pérdida del 15 % de CNT, sin diferencias significativas respecto al grupo no lavado.

Viabilidad: >80% en ambos grupos.

CD34<sup>+</sup>: pérdida de CD34<sup>+</sup> del 29%, aunque no se correlacionó con el tiempo de injerto.

Cultivos clonogénicos: tras el lavado observan una pérdida significativa de CFU-C (63,95 a 25,5,  $p = 0,043$ ) y un ganancia de BFU-E y CFU-GEMM no significativa respecto al grupo no lavado.

➤ *Comentario:* en conformidad con nuestros resultados obtienen una pérdida de CNT tras el lavado, aunque no significativa, manteniendo una buena viabilidad. En cambio obtienen una pérdida de CD34<sup>+</sup> y de CFU-C.

## DISCUSIÓN

**Calmels** (BMT 2003) (200) analizan un método automático de lavado de PHSP comparando con los recuentos del producto descongelado.

- *Muestra:* estudio preclínico, 16 procedimientos de 39 bolsas destinadas a la destrucción por muerte del receptor.
- *Tipo de TPH:* SP.
- *Crioprotector:* 10% DMSO.
- *Método de lavado:* CytoMate™ (membrana de filtración).
- *Solución de lavado:* tampón PBS suplementado con: 5% Dextrano 40, 5% ACD-A, 1% HSA.
- *Resultados:*
  - CNT: recuperación del 66%.
  - Viabilidad: 72%.
  - CD34<sup>+</sup>: recuperación del 66%.
  - Cultivos clonogénicos: recuperación de CFU-GM del 63%.
- *Comentario:* tras el lavado obtienen unas recuperaciones cercanas al 70% en todas las variables analizadas, marcadamente inferiores a los resultados constatados por nuestro grupo y otros, como por ejemplo, el grupo de Rodríguez L et al. (146) que argumenta que las diferencias con las recuperaciones de CD34<sup>+</sup> podrían estar influenciadas por la calidad del producto descongelado.

**Rodríguez et al.** (Transfusion 2005) (146) analizan un método automático de lavado de PHSP comparando con los recuentos del producto descongelado:

- *Muestra:* 15 procedimientos en un total de 20 bolsas excluidas para TPH.
- *Tipo de TPH:* SP.
- *Crioprotector:* 10% DMSO.
- *Método de lavado:* CytoMate.
- *Solución de lavado:* PBS con 5% Dextrano-40, 5% HSA y 5% citrato sódico.
- *Resultados:*
  - CNT: recuperación del 89% (sin diferencias significativas respecto al control no lavado).
  - Viabilidad: 87% (frente al 73 % en el grupo control no lavado,  $p=0,04$ ).
  - CD34<sup>+</sup>: pérdida despreciable en ambos grupos. Recuperación del 103% en el grupo lavado (frente al 94% del control no lavado,  $p=0,04$  al comparar ambas recuperaciones).

## DISCUSIÓN

Cultivos clonogénicos. Recuperación de CFU-GM del 91% (sin diferencias significativas respecto al control no lavado).

Realizan lavados secuenciales, no juntan bolsas para su lavado, argumentando que en experimentos anteriores encontraron más agregados celulares cuando juntaron bolsas.

Las diferencias con las recuperaciones de CD34<sup>+</sup>, respecto a las constatadas por Calmels (66%) y Perotti (70%) podrían estar influenciadas por la calidad del producto descongelado, con valores inferiores a los reportados con Rodríguez L.

- ✦ *Comentario:* cuando comparan el grupo lavado frente al grupo control (no lavado) demuestran que no hay diferencias significativas en el recuento de CNT y de cultivos clonogénicos, mostrando en ambos grupos muy buenas recuperaciones de las variables estudiadas. Únicamente muestran una pérdida significativa de CD34<sup>+</sup> en el grupo control respecto al grupo lavado. Estos resultados son equiparables a los nuestros, pero con una recuperación de CNT superior.

**Rodríguez et al.** (Vox Sanguinis 2004)(202) comparan un método automático de lavado frente a un método manual, partiendo de los recuentos del producto descongelado:

- ✦ *Muestra:* 20 unidades de SCU: 10 sometidas a lavado con Sepax® y otras 10 sometidas a lavado manual.
- ✦ *Tipo de TPH:* SCU.
- ✦ *Crioprotector:* 10% DMSO.
- ✦ *Método de lavado:* Sepax® S-100 frente método manual.
- ✦ *Solución de lavado:* Solución salina suplementada con 7,5 % Dextrano-40 y 5% albúmina humana.
- ✦ *Resultados:*
  - CNT: recuperación del 89% con Sepax® frente al 94% con método manual ( $p=NS$ ).
  - Viabilidad medida mediante tinción de 7-AAD y según la población analizada, tenemos: 38 % (CD 45<sup>+</sup>), un 5 % (Neutrófilos) y 94,5% (CD 34<sup>+</sup>).
  - CD34<sup>+</sup>: recuperación del 94% con Sepax® frente al 92% con método manual ( $p=NS$ ).
  - Cultivos clonogénicos: recuperación de CFU-total del 96% con Sepax® frente al 95% con método manual ( $p=NS$ ).
- ✦ *Comentario:* cuando comparan el método automático frente al manual demuestran que el recuento de CD34<sup>+</sup>, de CNT y de CFU-total no sufren cambios significativos, mostrando en ambos grupos muy buenas recuperaciones de las variables estudiadas.

## DISCUSIÓN

Únicamente observan una pérdida mayor de CNT, aunque no significativa, en el grupo lavado con el método automático. Su recuperación de CNT es algo mayor que la nuestra. Respecto a la viabilidad, demuestran como el responsable de su bajo valor (38%) es el daño severo que sufre la población de granulocitos durante el proceso. Resultados similares a los obtenidos con el lavado manual.

**Sánchez-Salinas** (Transfusion 2012) (11) analizan un método automático de lavado de PHSP comparando con los recuentos del producto descongelado:

- *Muestra:* 46 procedimientos de 26 pacientes con hemopatías malignas y tumores sólidos.
- *Tipo de TPH:* SP.
- *Crioprotector:* 9% DMSO.
- *Método de lavado:* Sepax® S-100.
- *Solución de lavado:* solución salina con 2,5 % albúmina humana.
- *Resultados:* se compara con un grupo control con 53 procesos de 26 pacientes:  
CNT: recuperación del 75,47% ( $p < 0,001$ ).  
Viabilidad total: pasa del 78,13 en el producto descongelado al 76,05 en el producto lavado ( $p = 0,68$ ).  
CD34<sup>+</sup>: recuperación del 94,66% ( $p = 0,08$ ).
- *Comentario:* estas observaciones iniciales de nuestro grupo se ven ahora corroboradas con una muestra considerablemente más amplia.

### • Efecto global del proceso de congelación, descongelación y lavado sobre los PH

Quando realizamos el análisis por bolsa, y como era previsible conociendo los resultados anteriores, encontramos una pérdida significativa de CNT, de colonias CFU-GM y BFU-E, y de viabilidad ( $p < 0,001$ ). En el análisis por tipo de lavado, vemos que los dos tipos de lavado se comportan igual, excepto en la pérdida de CFU-GM, que es significativamente mayor en el caso del subgrupo lavado con SSA ( $p = 0,011$ ). No se detectan cambios significativos en los recuentos de CD34<sup>+</sup>.

## DISCUSIÓN

Cuando realizamos el análisis por proceso y por paciente los resultados obtenidos son idénticos en términos de significación estadística. La única diferencia estriba en que, en estos últimos los dos tipos de lavados se comportan igual para todas las variables analizadas. Por lo tanto, la diferencia encontrada en el análisis por bolsa, demostrando una pérdida de CFU-GM mayor en el subgrupo lavado con SSA, debe considerarse con precaución, teniendo en cuenta que podría estar influido por la suposición inicial de que las células están distribuidas equitativamente en las bolsas congeladas.

Por lo tanto y de acuerdo a nuestros resultados, podemos concluir que el proceso completo de congelación, descongelación y lavado al que se ven sometidos los progenitores hematopoyéticos conlleva consigo una pérdida significativa de CNT, de colonias CFU-GM y BFU-E y de viabilidad. No encontrando diferencias al comparar entre ambos tipos de lavado, salvo en el análisis por bolsa, que muestra una pérdida de CFU-GM mayor en el subgrupo lavado con SSA. Resulta reseñable que las células CD34<sup>+</sup> no experimentan cambios significativos en el proceso global. El análisis desglosado por etapas nos proporciona información sobre el momento en el cual acontecen dichas pérdidas. Así, vemos que la pérdida de colonias, CFU-GM y BFU-E, y de viabilidad se produce en el proceso de congelación y descongelación de la muestra, mientras que la pérdida de CNT sucede durante el proceso de lavado y es mayor en el subgrupo lavado con SSA en el análisis por bolsa.

**Laroche et al.** (Transfusion 2005) (198) analizan el efecto que tiene sobre los progenitores hematopoyéticos de SCU el proceso de congelación/descongelación y lavado celular mediante un método manual:

- *Muestra:* 10 unidades de SCU.
- *Tipo de TPH:* SCU.
- *Crioprotector:* 10% DMSO y 1% Dextrano 40.
- *Método de lavado:* manual basado en el método de Rubinstein et al. (4).
- *Solución de lavado:* 10% Dextrano 40 y 5% Albúmina humana.
- *Resultados:*

CNT: recuperación del 82% en el producto lavado y del 89% en el producto descongelado, tomando como punto de partida el recuento previo a la congelación. De la pérdida total de CNT a lo largo del proceso, que supone el 18%, casi la mitad (7%) se

## DISCUSIÓN

pierden durante el lavado. Partiendo del recuento en el producto descongelado, la recuperación de CNT fue del 95%.

Viabilidad total (Ioduro de propidio/naranja de acridina): decrece significativamente tras la descongelación (de un 97% a un 62%,  $p<0.001$ ), sin cambios significativos tras el lavado.

CD34<sup>+</sup>: sin variaciones significativas a lo largo del proceso. Con unas recuperaciones del 97% tras el descongelado y del 148,9% tras el lavado.

Cultivos clonogénicos: las CFU decrecen tras la descongelación (pasan de  $904,1 \times 10^6$  a  $152,5 \times 10^6$  células, recuperación del 16,86%) y se recuperan tras el lavado ( $576,5 \times 10^6$ , recuperación del 378 %) ( $p<0.001$ ), aunque el valor es significativamente más bajo que el valor previo a la congelación ( $p<0.01$ ).

- *Comentario*: nuestros resultados concuerdan con los anteriores, excepto en lo referente a la pérdida de CNT. Con nuestra técnica se obtiene una recuperación de CNT del 82% en el producto lavado, pero del 108% respecto al producto descongelado. Por lo tanto, toda la pérdida se produce con el lavado. Respecto al incremento de colonias tras el lavado, coincidimos con sus resultados cuando realizamos el análisis agregado por proceso y por trasplante, pero no en el análisis por bolsa, que no muestra diferencias.

Se piensa que el DMSO puede producir un efecto inhibitor sobre las colonias celulares y el lavado con la eliminación del DMSO justificaría el aumento de colonias (143). También la presencia de células muertas podría tener un impacto negativo en el crecimiento de colonias (198).

**Rubinstein et al.** (4) analizan el efecto del lavado manual de progenitores hematopoyéticos de SCU partiendo del momento previo a la congelación.

- *Muestra*: 13 unidades de SCU.
- *Tipo de TPH*: SCU.
- *Crioprotector*: 10% DMSO.
- *Método de lavado*: manual.
- *Solución de lavado*: solución salina isotónica con 2,5% Albúmina humana y 5% Dextrano-40.
- *Resultados*:  
CNT: 8% de pérdida celular en el producto lavado (recuperación del 92%), sin diferencias significativas respecto al producto no lavado.

## DISCUSIÓN

Viabilidad total: pérdida del 39% (recuperación 61%) en el producto lavado frente al 65% sin lavado (recuperación 35%)

Ensayos de progenitores hematopoyéticos (equivalentes a los ensayos de unidades formadoras de colonias): descenso significativo tras el descongelado y una recuperación postlavado cercana al 100% (frente al 40% sin lavado).

- ✚ *Comentario*: presentan una pequeña pérdida de CNT, no significativa cuando la comparan con el producto no sometido a lavado. Por lo tanto, esa pérdida podría ser consecuencia del proceso de congelación-descongelación y no del lavado. Respecto a la viabilidad total obtienen una pérdida de casi el 40% partiendo del producto fresco, pero menor que la producida en el producto no lavado. Esto hace pensar que, por un lado, la mayor pérdida de la viabilidad se da en el proceso de congelación-descongelación y por otro lado, que quizás la eliminación del DMSO preserve la viabilidad celular.

**Akkök et al.** (Transfusion 2009) (197) analizan el efecto del lavado manual de PHSP partiendo del momento previo a la congelación.

- ✚ *Muestra*: 19 pacientes con hemopatías sometidos a TPH.

- ✚ *Tipo de TPH*: SP.

- ✚ *Crioprotector*: 10% DMSO.

- ✚ *Método de lavado*: manual (un único ciclo).

- ✚ *Solución de lavado*: 1000 ml salino+110 mL ACD-A.

- ✚ *Resultados*:

CNT: pérdidas significativas de CNT ( $p=0,005$ ) con recuperaciones cercanas al 90%.

CD34<sup>+</sup>: pérdidas significativas ( $p=0,027$ ) con recuperaciones del 76,9%.

- ✚ *Comentario*: A lo largo del proceso presentan pérdidas significativas de CNT y de CD34<sup>+</sup>, con buenas recuperaciones. Aunque en este caso, al no disponer de los datos de recuperaciones tras la descongelación, no podemos saber en que momento se producen esas pérdidas.

## DISCUSIÓN

**Fois et al.** (BMT 2007)(152) analizan el efecto del lavado automático partiendo del momento previo a la congelación.

- *Muestra:* 886 pacientes con hemopatías malignas y tumores sólidos. Total: 952 bolsas.
- *Tipo de TPH:* SP.
- *Crioprotector:* 10% DMSO+HES (Voluven®).
- *Método de lavado:* Cobe 2991.
- *Solución de lavado:* solución salina+10% ACD.
- *Resultados:*

CNT: recuperación  $55,9 \pm 18,6$ .

Viabilidad:  $68,25 \pm 18,9\%$ .

CD34<sup>+</sup>: recuperación  $98,0 \pm 36,5\%$ .

- *Comentario:* la recuperación de CD34<sup>+</sup> tras el proceso global de congelación-descongelación y lavado es prácticamente del 100%. Estos resultados contrastan con los obtenidos en las pruebas iniciales de lavado realizadas en nuestro laboratorio, en las que obteníamos una pérdida de CNT y de CD34<sup>+</sup> similar, en torno al 20% (datos no publicados). La pérdida de CNT y de viabilidad es mayor que la obtenida en nuestro trabajo. Cuando estudian los resultados por patologías encuentran un descenso significativo en la recuperación de CNT y de la viabilidad en los pacientes con mieloma respecto al resto de patologías y especulan que, podría estar relacionado con el mayor recuento de granulocitos en las bolsas de recolección de aféresis de pacientes con mieloma respecto de otras patologías (48 versus 40%,  $p < 0.0001$ ). También plantean la hipótesis de que la inmunoglobulina monoclonal reduce la recuperación y la viabilidad de CNT facilitando la agregación de célula madura, la activación y finalmente la muerte celular.

**Saccardi et al.** (ASH 2012) (12) analizan el efecto del lavado automático partiendo del momento previo a la congelación.

- *Muestra y patología:* 43 pacientes.
- *Tipo de TPH:* SP.
- *Crioprotector:* 10% DMSO.
- *Método de lavado:* Sepax®.
- *Solución de lavado:* Voluven®.

## DISCUSIÓN

### ➤ *Resultados:*

CD34<sup>+</sup>: recuperación del  $102,2 \pm 27$  % en el producto lavado.

Viabilidad CD34<sup>+</sup>:  $87,2\% \pm 10\%$ .

- *Comentario:* presentan una recuperación completa de CD34<sup>+</sup> tras el proceso global de congelación-descongelación y lavado, con una viabilidad cercana al 90%. No están publicados los datos referentes a CNT.

**Scerpa et al.** (Transfusion 2011) (203) analizan el efecto del lavado automático de PHSP partiendo del momento previo a la congelación.

- *Muestra:* pacientes con hemopatías malignas (8), neuroblastoma (1) y rhabdomyosarcoma (1).

- *Tipo de TPH:* SP.

- *Crioprotector:* 10% DMSO.

- *Método de lavado:* Sepax<sup>®</sup>-S100 frente al método manual.

- *Solución de lavado:* 10% Dextrano 40, 5% albúmina humana y 10% ACD-A.

- *Resultados :*

CNT: recuperación del  $91,92 \pm 12,60$  Sepax<sup>®</sup> vs  $84,7 \pm 22,9$  método manual ( $p=NS$ )

CD34<sup>+</sup>: recuperación del  $88,30 \pm 13,16$  Sepax<sup>®</sup> vs  $80,29 \pm 25,96\%$  método manual ( $p=NS$ ).

Cultivos clonogénicos: recuperación de CFU-totales  $75,75 \pm 20,62$  Sepax<sup>®</sup> vs  $62,57 \pm 26,25$  método manual ( $p=NS$ ).

- *Comentario:* las recuperaciones para todas las variables estudiadas son mayores con el método automático que con el método manual, sin encontrar diferencias significativas entre ambos métodos. La comparación entre el método manual y el automático se llevó a cabo sobre muestras procedentes del mismo paciente, recogidas de un único proceso de aféresis y repartido en dos alícuotas. Corroborando nuestros resultados con datos similares respecto a las recuperaciones de CNT y CD34<sup>+</sup>. Respecto a las colonias únicamente publican datos de las CFU-totales, con lo cual no podemos hacer comparaciones.

## DISCUSIÓN

**Perotti et al.** (Transfusion 2005) (201) analizan el efecto del lavado automático de progenitores hematopoyéticos de SCU partiendo del momento previo a la congelación y del producto descongelado.

➤ *Muestra:* 25 unidades de SCU descartadas para su uso.

➤ *Tipo de TPH:* SCU.

➤ *Crioprotector:* 10% DMSO.

➤ *Método de lavado:* Cytomate.

➤ *Solución de lavado:* solución salina.

➤ *Resultados:*

CNT: recuperación del 40,5% en el producto lavado y del 63,91% en el producto descongelado, tomando como punto de partida el recuento previo a la congelación. De la pérdida total de CNT a lo largo del proceso, que supone el 59,5%, un 23,41% se produce durante el lavado. Partiendo del producto descongelado, la recuperación de CNT fue del 63,30% en el producto lavado.

Viabilidad: 70,61% en el producto lavado y 73,43% en el producto descongelado, partiendo de los recuentos previos a la congelación, por lo que solo un 2,8% de la viabilidad se perdería durante el lavado. Partiendo del producto descongelado, la recuperación de la viabilidad fue del 89,67%.

CD34<sup>+</sup>: recuperación del 78,5% en el producto lavado y del 111,9% en el producto descongelado, partiendo de los recuentos previos a la congelación. Por lo tanto, una pérdida del 41,4% se produciría durante el lavado. Partiendo del producto descongelado, la recuperación células CD34<sup>+</sup> fue del 70,20%.

Cultivos clonogénicos: obtuvieron una recuperación del 54,59% de CFU-GM en el producto lavado y del 73,15% en el producto descongelado, partiendo de los recuentos previos a la congelación; por lo que se produjo una pérdida del 18,56% durante el lavado (un 40% del total de la pérdida). Partiendo del producto descongelado, la recuperación de CFU-GM fue del 74,33%.

➤ *Comentario:* inicialmente obtienen una ganancia de CD34<sup>+</sup> tras la descongelación respecto al producto fresco. Esto consideran que podría ser atribuido a una interferencia ejercida durante todo el proceso de congelación, en particular debido al DMSO, en algunos epítomos expresados en los progenitores hematopoyéticos cuando se realizó el análisis por citometría de flujo. Sus resultados, en cuanto a las recuperaciones de CNT y células CD34<sup>+</sup> en el producto lavado y tomando como punto de partida el producto

## DISCUSIÓN

descongelado, son inferiores a la mayoría de los resultados expuestos, incluidos los nuestros, y comparables a las obtenidas por Calmels et al.: 63,30% vs 66% para las CNT y 70,20% vs 66% para las células CD34<sup>+</sup> respectivamente. En ambos casos se utilizó el Cytomate como sistema automático de lavado.

El lavado manual basado en el modelo de Rubinstein, aunque es ampliamente utilizado, puede resultar en una pérdida impredecible de progenitores hematopoyéticos y, consiguientemente, estimular la formación de agregados celulares (199). Por el contrario, los lavados automáticos ofrecen una reproductibilidad de los resultados en todos los laboratorios de manipulación celular y criopreservación (202). Por otra parte el coste del kit para Sepax® oscila entre 150 a 200 USD. En el caso del procesamiento manual se ha calculado un coste de 200 \$ por el operador y 100 \$ por materiales. Otra ventaja importante del procedimiento automático de la Sepax®, en comparación con el enfoque manual, es que todo el ciclo del procesamiento se realiza en un sistema totalmente estéril y cerrado, de conformidad con las directrices GMP (196,204).

Respecto a las colonias clonogénicas llama la atención que después de la descongelación, en ocasiones, se recupera un número de colonias superior al de antes de la congelación (306,307). Esto podría deberse a la destrucción por la criopreservación de subpoblaciones celulares que intervienen en la compleja red de factores estimulantes/inhibitorios, y que si bien no aumentan el número de CFU-GM existentes, sí aumentan el número de colonias capaces de desarrollarse en cultivo y por lo tanto detectables (308). Las comparaciones de dosis de CFU-GM entre equipos son de dudoso valor, por la gran variabilidad entre ellas (309), incluso estandarizando los medios de cultivo. Spitzer fue uno de los primeros en establecer las CFU-GM como de valor pronóstico en la predicción de injerto y estableció una correlación lineal entre el injerto granulocitario y la dosis/kg de CFU-GM infundidas (310). Gorin no logró reproducir la correlación entre las CFU-GM infundidas y el injerto granulocitario, pero encontró que, en su experiencia, es necesario respetar un umbral mínimo de CFU-GM/kg para garantizar un injerto seguro y lo estableció en más de  $1 \times 10^3$  CFU-GM/kg para su laboratorio (306). Es difícil determinar la cantidad de células necesarias para un injerto pues el potencial de injerto es diferente según la variable presencia de células con diferente grado de maduración y diferenciación (311,312). Por otra parte no se puede dejar de tener en cuenta que el efecto de la dosis de progenitores sobre el injerto debe estar relacionado con los efectos de la enfermedad o los efectos del

## DISCUSIÓN

tratamiento de la enfermedad sobre la viabilidad y funcionalidad de las células progenitoras más inmaduras, independientemente de su cantidad. En nuestro grupo la media de CFU-GM/Kg infundidas por trasplante fue de  $0,7536 \times 10^6/\text{Kg}$  y de BFU-E de  $0,9248 \times 10^6/\text{Kg}$ , con una dispersión de datos muy grande. Hemos observado como en el cálculo de las recuperaciones estas diferencias se magnifican obteniendo recuperaciones, en algunos casos particulares,  $>1000\%$  lo cual explica la contradicción de recuperaciones globales  $>100\%$  en casos donde las diferencias de las medias absolutas informan de pérdidas significativas. Probablemente son muchas las variables que pueden haber influido en la dispersión de nuestros resultados en los recuentos de colonias como la variabilidad de la técnica, el cambio de instalaciones y el cambio de sistema de suministro de CO<sub>2</sub> en nuestro laboratorio.

A pesar de la pérdida de CNT tras el lavado celular que obtenemos en nuestro estudio al igual que otros investigadores, no hay repercusión en el injerto. Justificado porque la pérdida celular se produce sobre todo a expensas de células polimorfonucleares, siendo cualitativamente más relevante que se preserve la población mononuclear, pues es en ese grupo celular en donde se encuentran los progenitores (308). Los granulocitos maduros son más vulnerables a la criopreservación que los progenitores hematopoyéticos, por lo que pueden resultar dañados y liberar moléculas de DNA de las células muertas, dando lugar a microagregados y aglutinación celular, pudiendo causar pérdida celular (313). El estrés al que se someten con la congelación y descongelación también puede causar liberación de los gránulos de los granulocitos y se ha postulado que esto podría poner en peligro el injerto en el receptor. Esta contaminación granular se ha relacionado con el incremento de elastasa polimorfonuclear, metaloproteinasas de matriz MMP-9 y citoquinas inflamatorias IL-1 Beta e IL-6 (314). En el caso de trasplante de sangre periférica se ha encontrado relación entre el elevado número de células nucleadas en el inóculo y el retraso del injerto en el receptor, a pesar de un número suficiente de células CD34<sup>+</sup> (314).

## DISCUSIÓN

### • Estudio comparativo entre la tasa de contaminación bacteriana del producto de aféresis y el producto lavado

La contaminación microbiana de los trasplantes representa un peligro importante dado el estado de inmunosupresión de los receptores. La FDA estima que al año podrían evitarse 7 muertes relacionadas con el trasplante por la eliminación de la infección relacionada con la infusión celular (315). En general las tasas publicadas de contaminación bacteriana oscilan entre 0-4,5% (316–322). Las bacterias más habituales son flora de la piel y bacterias comensales. El resto son principalmente bacterias entéricas.

Existen estudios que muestran como el proceso de criopreservación se asocia con una reducción de microorganismos detectables. Así, un estudio alemán demuestra como la detección de *Staphylococcus epidermidis* se redujo en un promedio del 9,3% y de *Escherichia coli* en un promedio del 18,1% (323). Además, varios estudios han informado de la presencia de cultivos positivos en el producto descongelado no manipulado (321,322), sugiriendo la contaminación de los frascos de hemocultivos. La incidencia de la sepsis grave tras la infusión de células madre, con cultivo positivo para bacterias comensales y flora de la piel, es baja y la mayoría de los episodios febriles responden al tratamiento antibiótico (321).

En nuestro estudio analizamos la tasa de aislamientos microbiológicos en el producto de aféresis y tras el lavado de los PHSP. En el análisis de la muestra total no se observan diferencias significativas en la tasa de aislamientos microbiológicos en la comparativa realizada entre aféresis y lavados. Sin embargo, en el análisis por tipo de lavado, la tasa de aislamientos microbiológicos decrece de forma significativa tras el lavado en el subgrupo lavado con Voluven®. En los dos subgrupos el germen aislado más frecuentemente fue el *Staphylococcus epidermidis*, seguido muy de lejos por *Staphylococcus warneii*, *Staphylococcus hominis* y *Streptococcus mitis*. Revisando cada caso en particular observamos que:

- En el subgrupo lavado con SSA cuatro bolsas contaminadas en el momento de la aféresis se negativizan tras el lavado. Por otro lado, 11 bolsas no contaminadas en el momento de la aféresis se contaminan tras el lavado.
- En el subgrupo lavado con Voluven® seis bolsas contaminadas en el momento de la aféresis se negativizan tras el lavado y ninguna, siendo negativa en el momento de la aféresis se contamina tras el lavado.

## DISCUSIÓN

Estos resultados podríamos interpretarlos como que el Voluven® tiene un efecto antimicrobiano; pero hay que considerar que, por un lado, las bolsas de SSA se lavaron antes en el tiempo que las de Voluven®, con lo que la diferencia podría estribar en un mejor conocimiento de la técnica, y, por otro lado, que la solución de lavado SSA hay que prepararla, con lo cual conlleva mayor riesgo de contaminación.

Cuando contrastamos estos datos con los aislamientos bacteriológicos de los pacientes, encontramos que tres pacientes con aislamientos positivos durante el trasplante recibieron un producto contaminado, pero en ninguno de ellos el patógeno aislado coincide con el aislado en las bolsas de PH.

Un trabajo publicado en 2007 por **Foïs et al.** (152) revela que tras el análisis microbiano de 952 productos de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica sometidos a lavado con la Cobe 2991, ninguno de ellos estaba contaminado en el momento de la aféresis ni después de los procedimientos de descongelación y lavado.

**Perotti et al.** en un trabajo publicado en 2005 (201) donde estudian el efecto de un método de lavado automático (Cytomate) en una muestra de 25 unidades de SCU, no detectan aislamientos microbiológicos positivos en ninguna de las muestras estudiadas en el momento de la aféresis ni tras de los procedimientos de descongelación y lavado.

**Calmels et al.** publican en 2003 (200) un estudio preclínico para evaluar un sistema automático de lavado (Cytomate), partiendo de una muestra de 39 bolsas de PHSP y constatan que todos los productos lavados fueron negativos para la contaminación aeróbica y anaeróbica.

**Sánchez-Salinas et al.** publican en 2012(11) un trabajo donde analizan 46 bolsas de PHSP lavadas con Sepax® y lo comparan frente a un grupo histórico de 53 bolsas no lavadas, observando tres contaminaciones microbianas positivas en los productos lavados y cinco en los productos no lavados, siendo el *Staphylococcus epidermidis* el tipo más común de microorganismo en ambos grupos, seguido por *Streptococcus viridans* y *Staphylococcus warnerii*, sin encontrar diferencias significativas en la incidencia de la contaminación microbiana entre ambos grupos, lavados y no lavados ( $p=0,59$ ).

## DISCUSIÓN

### • Estudio de eficacia del procedimiento de lavado comparando las características del injerto en ambos subgrupos según la solución de lavado empleada

La media de células CD34<sup>+</sup>x10<sup>6</sup>/kg infundidas por trasplante (analizado en el producto lavado) en ambos subgrupos fue 4,38 (± 0,35) para SSA y 4,76 (± 0,63) para Voluven<sup>®</sup>, sin diferencias significativas entre ambos grupos ( $p=0,567$ ).

Referente al análisis de los tiempos de injerto por subgrupo de lavado, no encontramos diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas, obteniendo una media de días en el injerto de leucocitos de 10,55 y 11,03 respectivamente para SSA y Voluven<sup>®</sup>; de 11,29 y 12,02 en el injerto de neutrófilos y de 13,19 y 14,77 en el injerto de plaquetas. El tiempo máximo de injerto de plaquetas por subgrupos fue de 113 días para un paciente del subgrupo lavado con Voluven<sup>®</sup> y de 50 días para un paciente del subgrupo lavado con SSA.

Cuando comparamos los requerimientos transfusionales de CH y de plaquetas en ambos subgrupos, no encontramos diferencias significativas entre ambos. La media de transfusiones de CH fue de 2,03 y 2,15 y la de plaquetas de 2,62 y 2,51 para SSA y Voluven<sup>®</sup> respectivamente.

**Syme et al. (2003)** (157) analizan el efecto de la disminución del DMSO en sus productos de aféresis, en una muestra de 56 pacientes con cáncer de mama (35 sometidos a lavado manual y 21 sin manipular), sin encontrar diferencias significativas al analizar los días de injerto, tanto leucocitario como plaquetar y de neutrófilos, ni los requerimientos transfusionales entre ambos grupos. La media de días de injerto en el grupo lavado fue de 11, 12 y 12 días para leucocitos, plaquetas y neutrófilos, respectivamente. Y la media de transfusiones de plaquetas y de CH en el grupo lavado, fue de 1,9 y 2, respectivamente. Son resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio.

**Akkök et al. (2009)** (197) analizan el efecto de la reducción del DMSO en una muestra de 53 pacientes con hemopatías malignas (19 se someten a lavado manual y 34 no se manipulan), sin encontrar diferencias significativas en cuanto al injerto de neutrófilos (11 días en ambos grupos) ni en los requerimientos transfusionales de CH (4 en grupo sin DMSO y 3 en grupo con DMSO). Sin embargo, si encuentran diferencias significativas en cuanto al injerto de plaquetas (14 días grupo sin DMSO frente a 12 días en el grupo con DMSO) y en

## DISCUSIÓN

los requerimientos transfusionales de plaquetas (4 días grupo sin DMSO frente a 2 días en el grupo con DMSO).

**Sanchez-Salinas et al. (2012)** (11) analizan el injerto de neutrófilos y de plaquetas en 26 pacientes infundidos con PHSP lavados con Sepax® frente a otros 26 pacientes que se trasplantan sin manipulación del producto descongelado, sin encontrar diferencias entre ambos. En el grupo lavado, el injerto tanto de neutrófilos como de plaquetas, se produce en el día 11.

DISCUSIÓN

OBJETIVO	AUTOR	MÉTODO LAVADO	TPH	Muestra	ACP	SOLUCIÓN LAVADO	RESULTADOS expresados en recuperaciones							
							CNT	VIABIL.	CD34	CULTIVOS CLONOG.	MICROB.	INJERTO (WBC, RAN, PLT)		
<b>Efecto CONGELACIÓN</b> Recuperaciones en el producto descongelado	R. Reich-Slotky et al. (2008)		SP	43	7,5 % DMSO			86,4 %						
	Laroche et al (2005)		SCU	10	10 % DMSO 1% Dextr 40			97 %						
	Perotti et al. (2005)		SCU	25	10 % DMSO			112 %						
	Cava C. (2015)		SP	158	10 % DMSO			108 %						
<b>Efecto LAVADO</b> Recuperaciones en el producto lavado		MANUAL												
	Syme et al (2004)		SP	35	10 % DMSO	Salino + ACD-A		>80%	71%					11, 12 y 12 días.
		AUTOMÁTICO												
	Calmels et al (2003)		SP	16	10 % DMSO	PBS + Dextrano 40 + ACD-A + HES		72 %	66 %				0 %	
	Rodríguez et al (2005)		SP	15	10 % DMSO	PBS + HSA+ Dextrano 40 + Citrato sódico		87 %	103 %					
	Rodríguez et al (2004)		SCU	10	10 % DMSO	Salino + Dextrano 40 + Albúmina		38 %	94 %					
	Sánchez-Salinas (2012)		SP	26	9% DMSO	Salino + Albúmina		76.06 %	94.66 %				6,5 %	ND, 11 y 11 días.

Tabla 51. Resumen de publicaciones sobre lavados de progenitores hematopoyéticos

DISCUSIÓN

OBJETIVO	AUTOR	MÉTODO LAVADO	TPH	Muestra	ACP	SOLUCIÓN LAVADO	RESULTADOS expresados en recuperaciones							
							CNT	VIABIL.	CD34	CULTIVOS CLONOG.	MICROB.	INJERTO (WBC, RAN, PLT)		
<i>Efecto CONGELACIÓN + LAVADO Comparando con los PH frescos y *(): Comparando con los PH descongelados</i>		MANUAL												
	Laroche et al (2005)		SCU	10	10% DMSO 1% Dextr 40	Dextrano 40 + Albúmina humana	82 % *(95 %)	<i>p=NS tras lavado</i>	148 %	Rec. media CFU-total: 63 % *(378 %)				
	Rubinstein et al. (1995)		SCU	13	10% DMSO	Salino + Dextrano 40 + Albúmina humana	92 % *(98 %)	61 % *(172 %)		Ensayos de PH: Rec. 117 % *(190 %)				
	Akkök (2009)		SP	19	10% DMSO	Salino + ACD-A	90 %		77 %			ND, 11 y 14 días		
			AUTOMÁTICO											
	Fois et al (2007)		Cobe 2991	SP	886	10% DMSO HES	Salino + ACD-A	56 %	68 %	98 %			0 %	
	Saccardi (2012)		Sepax	SP	43	10% DMSO	Volugen		CD 34*: 87 %	102 %				
	Scerpa et al. (2011)		Sepax	SP	10	10% DMSO	Dextrano 40 + Albúmina + ACD-A	91 %		88 %				
	Perotti et al. (2005)		CytoMate	SCU	25	10% DMSO	Salino	40 % *(63 %)	70 % *(89 %)	78 % *(70 %)	CFU-GM: 54 % *(74 %)		0 %	
	Cava C. (2015)		Sepax	SP	96	10% DMSO	SSA	84 % *(75 %)	83 % *(102 %)	111 % (113 %)	CFU-GM: 75 % *(163 %) BFU-E: 144 % *(126 %)		8 %	10, 11 y 13 días
					62		Volugen	79 % *(79 %)	85 % *(101 %)	103 % *(110 %)	CFU-GM: 103 % *(187 %) BFU-E: 131 % *(141 %)		3 %	11,12 y 15 días

Tabla 51. Resumen de publicaciones sobre lavados de progenitores hematopoyéticos

## DISCUSIÓN

Al iniciar el programa de trasplante hematopoyético infantil, nuestro grupo decidió evitar las reacciones infusionales de los progenitores hematopoyéticos autólogos criopreservados con DMSO lavándolos tras la descongelación. Nos decantamos por un sistema completamente automatizado, el Sepax®, para asegurar la estandarización del procedimiento y minimizar la posibilidad de errores. Utilizamos como solución de lavado SSA, y demostramos que la combinación Sepax®-SSA era segura y eficaz (11). En el año 2012 coorganizamos un ensayo clínico, prospectivo y multicéntrico en el que participaron 4 centros europeos trasplantadores (12) para validar el Hidroxietil almidón (Voluven®) como solución de lavado en el mismo sistema. Nuestra intención era encontrar una solución de lavado libre de productos de procedencia humana, estéril y seguro para la infusión. También nos atraía que no precisaba de suplementaciones, reduciendo así las manipulaciones a realizar durante el lavado. Nuestros resultados fueron positivos y han sido recientemente confirmados en un estudio por Reich-Slotky y col. (221). No se había realizado hasta ahora, sin embargo, una comparación directa entre las dos soluciones de lavado. Los resultados de nuestro trabajo demuestran que el Voluven es una solución de lavado al menos igual de eficaz y segura que nuestro estándar anterior, el SSA. Pequeñas diferencias como la facilidad de manejo, ausencia de productos de procedencia humana o animal, posible mejor acomodación de las células, tal y como las diferencias en los estudios clonogénicos parecen apuntar, y ausencia de necesidad de suplementación, disminuyendo las ocasiones de contaminación, han hecho que el Voluven se haya convertido en nuestro nuevo estándar para el procedimiento de lavado de progenitores hematopoyéticos criopreservados con DMSO.

## DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

**CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

- 1. El procedimiento de congelación-descongelación tiene un impacto negativo sobre la viabilidad total y los cultivos clonogénicos ensayados: CFU-GM y BFU-E.**
- 2. El procedimiento de lavado para la eliminación del crioprotector de los progenitores hematopéticos de sangre periférica criopreservados, usando un procedimiento automático y estéril (Sepax®), no afecta de forma significativa al recuento de las células CD34<sup>+</sup>, ni a la viabilidad total, ni a los cultivos clonogénicos ensayados.**
- 3. Las dos soluciones de lavado empleadas, solución salina suplementada con Albúmina (SSA) y el Hidroxietil almidón (Voluven®), son igual de eficaces para el lavado de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica criopreservados, asegurando una buena recuperación de células CD34<sup>+</sup> y preservando su viabilidad y potencial de injerto.**
- 4. Los procedimientos de lavado utilizados conllevan una pérdida significativa de células nucleadas totales, que es superior en el subgrupo lavado con solución salina suplementada con Albúmina (SSA), sin verse por ello afectado el potencial de injerto.**
- 5. Las soluciones de lavado investigadas evitan las reacciones adversas relacionadas con la infusión de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica criopreservados con dimetil sulfóxido.**
- 6. El Hidroxietil almidón (Voluven®) representa una excelente alternativa como solución de lavado fácil de usar, con menor riesgo de contaminación y libre de productos de procedencia humana.**

## CONCLUSIONES

## BIBLIOGRAFÍA

## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Barnes DW, Loutit JF. The radiation recovery factor: preservation by the Polge-Smith-Parkes technique. *J Natl Cancer Inst.* febrero de 1955;15(4):901-5.
2. Cavins JA, Kasakura S, Thomas ED, Ferrebee JW. Recovery of lethally irradiated dogs following infusion of autologous marrow stored at low temperature in dimethylsulphoxide. *Blood.* diciembre de 1962;20:730-4.
3. 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.* enero de 1998;21(1):1-7.
4. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Migliaccio G, Migliaccio AR, et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24 de octubre de 1995;92(22):10119-22.
5. Alessandrino P, Bernasconi P, Caldera D, Colombo A, Bonfichi M, Malcovati L, et al. Adverse events occurring during bone marrow or peripheral blood progenitor cell infusion: analysis of 126 cases. *Bone Marrow Transplant.* marzo de 1999;23(6):533-7.
6. López-Jiménez J, Cerveró C, Muñoz A, Hernández-Madrid A, Fernández Pineda J, García Laraña J, et al. Cardiovascular toxicities related to the infusion of cryopreserved grafts: results of a controlled study. *Bone Marrow Transplant.* junio de 1994;13(6):789-93.
7. Okamoto Y, Takaue Y, Saito S, Shimizu T, Suzue T, Abe T, et al. Toxicities associated with cryopreserved and thawed peripheral blood stem cell autografts in children with active cancer. *Transfusion (Paris).* julio de 1993;33(7):578-81.
8. Perseghin P, Balduzzi A, Bonanomi S, Dassi M, Buscemi F, Longoni D, et al. Infusion-related side-effects in children undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemia. *Bone Marrow Transplant.* julio de 2000;26(1):116-8.
9. Styler MJ, Topolsky DL, Crilley PA, Covalesky V, Bryan R, Bulova S, et al. Transient high grade heart block following autologous bone marrow infusion. *Bone Marrow Transplant.* noviembre de 1992;10(5):435-8.
10. Windrum P, Morris TCM, Drake MB, Niederwieser D, Ruutu T, EBMT Chronic Leukaemia Working Party Complications Subcommittee. Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres. *Bone Marrow Transplant.* octubre de 2005;36(7):601-3.
11. Sánchez-Salinas A, Cabañas-Perianes V, Blanquer M, Majado MJ, Insausti CL, Monserrat J, et al. An automatic wash method for dimethyl sulfoxide removal in autologous hematopoietic stem cell transplantation decreases the adverse effects related to infusion. *Transfusion (Paris).* noviembre de 2012;52(11):2382-6.

## BIBLIOGRAFÍA

12. Fully Automated Washing of Cryopreserved Peripheral Blood Stem Cells (PBSC): Results of a Prospective, Multicenter, Clinical Trial. -- Saccardi et al. 120 (21): 3164 -- ASH Annual Meeting Abstracts [Internet]. [citado 17 de septiembre de 2015]. Recuperado a partir de: <http://abstracts.hematologylibrary.org/cgi/content/abstract/120/21/3164?Maxtoshow=&hits=10&RESULTFORMAT=&fulltext=blanquer&searchid=1&FIRSTINDEX=0&volume=120&issue=21&resourcetype=HWCIT>
13. Mosler F. Klinische Symptome und Therapie der medullären Leukämie. Berl Klin Wochenschr. (1876)13:702.
14. McCulloch EA, Till JE. Perspectives on the properties of stem cells. Nat Med. octubre de 2005;11(10):1026-8.
15. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet. octubre de 1970;3(4):393-403.
16. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. J Cell Physiol. noviembre de 2007;213(2):341-7.
17. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. Ciba Found Symp. 1988;136:42-60.
18. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. Cell Tissue Kinet. mayo de 1987;20(3):263-72.
19. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol. septiembre de 1976;4(5):267-74.
20. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 2 de abril de 1999;284(5411):143-7.
21. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. J Clin Invest. mayo de 2006;116(5):1195-201.
22. Russell NH, Gratwohl A, Schmitz N. Developments in allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation. Br J Haematol. diciembre de 1998;103(3):594-600.
23. A. Persaud MD. Keith L. Embriología Clínica. 6 .ed. México. Mc Graw Hill Interamericana. 1999.599p. (43-46, 66-32).
24. Rodríguez VM, Cuéllar A, Cuspoca LM, Contreras CL, Mercado M, Gómez A. [Phenotypical determinants of stem cell subpopulations derived from human umbilical cord blood]. Bioméd Rev Inst Nac Salud. marzo de 2006;26(1):51-60.
25. 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.

## BIBLIOGRAFÍA

26. Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol.* noviembre de 1992;49(5):225-33.
27. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* 1978;4(1-2):7-25.
28. Méndez-Ferrer S, Frenette PS. Hematopoietic stem cell trafficking: regulated adhesion and attraction to bone marrow microenvironment. *Ann N Y Acad Sci.* noviembre de 2007;1116:392-413.
29. Méndez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature.* 27 de marzo de 2008;452(7186):442-7.
30. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood.* 1 de junio de 1993;81(11):2844-53.
31. Ploemacher RE. Characterisation and biology of normal human haematopoietic stem cells. *Haematologica.* junio de 1999;84 Suppl EHA-4:4-7.
32. Liu H, Verfaillie CM. Myeloid-lymphoid initiating cells (ML-IC) are highly enriched in the rhodamine-c-kit(+)CD33(-)CD38(-) fraction of umbilical cord CD34(+) cells. *Exp Hematol.* junio de 2002;30(6):582-9.
33. 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.
34. Kim DK, Fujiki Y, Fukushima T, Ema H, Shibuya A, Nakauchi H. Comparison of hematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 positive and negative cells. *Stem Cells Dayt Ohio.* 1999;17(5):286-94.
35. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood.* 1 de enero de 1996;87(1):1-13.
36. Shaheen M, Broxmeyer HE. The humoral regulation of hematopoiesis. En: Hoffman R (ed). *Hematology. Basic principles and practice.* Elsevier 2005;233-65. En.
37. Han ZC, Caen JP. Cytokines acting on committed haematopoietic progenitors. *Baillières Clin Haematol.* marzo de 1994;7(1):65-89.
38. Testa N, Dexter M. The regulation of haemopoietic cell production. En: Hoffbrand AV, Lewis SM, Tuddenham EGD (eds.). *Postgraduate haematology.* Oxford 1999;1-12. En.
39. Pérez Calvo J.: Factores que influyen sobre el injerto en el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica; Director: Villegas Martínez A, Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Medicina. [Internet]. [citado 18 de junio de 2015]. Recuperado a partir de: <http://biblioteca.ucm.es/tesis/med/ucm-t26419.pdf>

## BIBLIOGRAFÍA

40. Dao M, Verfaillie CM. Bone marrow microenvironment. En: Hoffman R (ed.) Hematology. Basic principles and practice. Elsevier 2005;215-231. En.
41. Liekens S, Schols D, Hatse S. CXCL12-CXCR4 axis in angiogenesis, metastasis and stem cell mobilization. *Curr Pharm Des.* 2010;16(35):3903-20.
42. Fukuda J, Kaneko T, Egashira M, Oshimi K. Direct measurement of CD34+ blood stem cell absolute counts by flow cytometry. *Stem Cells Dayt Ohio.* 1998;16(4):294-300.
43. Fornas O, Garcia J, Petriz J. Flow cytometry counting of CD34+ cells in whole blood. *Nat Med.* julio de 2000;6(7):833-6.
44. Belvedere O, Feruglio C, Malangone W, Bonora ML, Minisini AM, Spizzo R, et al. Increased blood volume and CD34(+)CD38(-) progenitor cell recovery using a novel umbilical cord blood collection system. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2000;18(4):245-51.
45. Infante E. Enumeración de células madre CD34+, cumpliendo con las recomendaciones ISHAGE, con determinación de viabilidad y conteo absoluto en un paso. Becton Dickinson, Doc. Tec. Marzo, 2005.
46. Serke S, Arseniev L, Watts M, Fritsch G, Ingles-Esteve J, Johnsen HE, et al. Imprecision of counting CFU-GM colonies and CD34-expressing cells. *Bone Marrow Transplant.* julio de 1997;20(1):57-61.
47. Johnsen HE, Baeck 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.* febrero de 1999;8(1):15-28.
48. 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.* junio de 1996;5(3):213-26.
49. Verfaillie CM, Ploemacher R, Di Persio J, Sutherland R, Serke S, Johnsen H, et al. Assays to determine hematopoietic stem cell content in blood or marrow grafts. *Cytotherapy.* 1999;1(1):41-9.
50. 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.
51. Lamana M, Albella B, Rodríguez F, Regidor C, Bueren JA. Conclusions of a national multicenter intercomparative study of in vitro cultures of human hematopoietic progenitors. *Bone Marrow Transplant.* febrero de 1999;23(4):373-80.
52. 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.* diciembre de 1989;74(8):2755-63.
53. 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.* octubre de 1989;74(5):1563-70.

## BIBLIOGRAFÍA

54. 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.
55. Appelbaum FR, Forman SJ, Negrin RS, Blume KG. Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation. John Wiley & Sons; 2011. 3655 p.
56. Pasquini MC, Wang Z. Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR Summary Slides, 2013. Available at: <http://www.cibmtr.org>.
57. Majhail NS, Murphy EA, Denzen EM, Ferguson SS, Ferguson SS, Anasetti C, et al. The National Marrow Donor Program's Symposium on Hematopoietic Cell Transplantation in 2020: a health care resource and infrastructure assessment. Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant. febrero de 2012;18(2):172-82.
58. Gooley TA, Chien JW, Pergam SA, Hingorani S, Sorrow ML, Boeckh M, et al. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. N Engl J Med. 25 de noviembre de 2010;363(22):2091-101.
59. Hahn T, McCarthy PL, Jr., Hassebroek A, et al. Significant improvement in survival after allogeneic hematopoietic cell transplantation during a period of significantly increased use, older recipient age, and use of unrelated donors. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2013;31:2437-2449.
60. Majhail NS, Tao L, Bredeson C, Davies S, Dehn J, Gajewski JL, et al. Prevalence of hematopoietic cell transplant survivors in the United States. Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant. octubre de 2013;19(10):1498-501.
61. McCarthy PL, Hahn T, Hassebroek A, Bredeson C, Gajewski J, Hale G, et al. Trends in use of and survival after autologous hematopoietic cell transplantation in North America, 1995-2005: significant improvement in survival for lymphoma and myeloma during a period of increasing recipient age. Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant. julio de 2013;19(7):1116-23.
62. LeMaistre CF, Farnia S, Crawford S, McGuirk J, Maziarz RT, Coates J, et al. Standardization of terminology for episodes of hematopoietic stem cell patient transplant care. Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant. junio de 2013;19(6):851-7.
63. Majhail NS, Giralt S, Bonagura A, Crawford S, Farnia S, Omel JL, et al. Guidelines for defining and implementing standard episode of care for hematopoietic stem cell transplantation within the context of clinical trials. Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant. abril de 2015;21(4):583-8.
64. British Society of Blood and Marrow Transplantation indications table. Available at <http://bsbmt.org/indications-table/> (accessed 02/01/2015).
65. NCCN Guidelines and Clinical Resources: NCCN categories of evidence and consensus. Available at [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/categories\\_of\\_consensus.asp](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/categories_of_consensus.asp).

## BIBLIOGRAFÍA

66. NMDP/Be The Match and ASBMT Referral Guidelines: Recommended Timing for Transplant Consultation, 2015. [www.asbmt.org](http://www.asbmt.org) and [BeTheMatchClinical.org/guidelines](http://BeTheMatchClinical.org/guidelines).
67. Michaelis LC, Hamadani M, Hari PN. Hematopoietic stem cell transplantation in older persons: respecting the heterogeneity of age. *Expert Rev Hematol.* junio de 2014;7(3):321-4.
68. McClune BL, Weisdorf DJ. Reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for older adults: is it the standard of care? *Curr Opin Hematol.* marzo de 2010;17(2):133-8.
69. Wildes TM, Stirewalt DL, Medeiros B, Hurria A. Hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies in older adults: geriatric principles in the transplant clinic. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN.* enero de 2014;12(1):128-36.
70. Moraleda JM, Iniesta F, Sánchez-Salinas A: Trasplante de progenitores hematopoyéticos; en Moraleda JM, (ed): *Pregrado de Hematología*. Luzán 5, S.A., 2011, pp 486-487.
71. Pons EC, Tarrats MR, Muñoz MCM. Manual de trasplante hemopoyético [Internet]. Antares; 2010. Recuperado a partir de: <https://books.google.es/books?id=d56tMwEACAAJ>
72. Fagundo JD, E. Pavón, V. Cortina, L. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas: tipos, fuentes e indicaciones.
73. 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.* octubre de 1995;9(5):355-63.
74. 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.* febrero de 1996;17(2):137-48.
75. Dupont B. Immunology of hematopoietic stem cell transplantation: a brief review of its history. *Immunol Rev.* junio de 1997;157:5-12.
76. Brown RA, Adkins D, Goodnough LT, Haug JS, Todd G, Wehde M, et al. Factors that influence the collection and engraftment of allogeneic peripheral-blood stem cells in patients with hematologic malignancies. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* septiembre de 1997;15(9):3067-74.
77. Prósper F, Solá C, Hornedo J, Arbona C, Menéndez P, Orfao A, et al. 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.* febrero de 2003;17(2):437-41.
78. Richman CM, Weiner RS, Yankee RA. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood.* junio de 1976;47(6):1031-9.

## BIBLIOGRAFÍA

79. 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*. 1 de noviembre de 1989;74(6):1905-14.
80. Schwartzberg LS, Birch R, Hazelton B, Tauer KW, Lee P, Altemose R, et al. Peripheral blood stem cell mobilization by chemotherapy with and without recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *J Hematother*. 1992;1(4):317-27.
81. 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*. marzo de 1992;80(3):327-31.
82. Brugger W, Bross K, Frisch J, Dern P, Weber B, Mertelsmann R, et al. 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*. 1 de marzo de 1992;79(5):1193-200.
83. Dührsen 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*. diciembre de 1988;72(6):2074-81.
84. Sheridan WP, Begley CG, Juttner CA, Szer J, To LB, Maher D, et al. Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilised by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Lancet Lond Engl*. 14 de marzo de 1992;339(8794):640-4.
85. 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*. 15 de septiembre de 1996;88(6):2033-42.
86. Desikan KR, Barlogie B, Jagannath S, Vesole DH, Siegel D, Fassas A, et al. 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. abril de 1998;16(4):1547-53.
87. Levesque J-P, Liu F, Simmons PJ, Betsuyaku T, Senior RM, Pham C, et al. Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice. *Blood*. 1 de julio de 2004;104(1):65-72.
88. Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I, Kollet O, DiPersio JF, Link D, et al. Stem cell mobilization. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2003;419-37.
89. To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood*. 1 de abril de 1997;89(7):2233-58.
90. Verfaillie CM. Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process. *Blood*. 15 de octubre de 1998;92(8):2609-12.

## BIBLIOGRAFÍA

91. Vermeulen M, Le Pesteur F, Gagnerault MC, Mary JY, Sainteny F, Lepault F. Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1 de agosto de 1998;92(3):894-900.
92. Lévesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK, Haylock DN, Simmons PJ. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 1 de septiembre de 2001;98(5):1289-97.
93. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 31 de mayo de 2002;109(5):625-37.
94. Gazitt Y, Freytes CO, Callander N, Tsai TW, Alsina M, Anderson J, et al. Successful PBSC mobilization with high-dose G-CSF for patients failing a first round of mobilization. *J Hematother*. abril de 1999;8(2):173-83.
95. Miller CB, Lazarus HM. Erythropoietin in stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. mayo de 2001;27(10):1011-6.
96. Glaspy JA, Shpall EJ, LeMaistre CF, Briddell RA, Menchaca DM, Turner SA, et al. Peripheral blood progenitor cell mobilization using stem cell factor in combination with filgrastim in breast cancer patients. *Blood*. 15 de octubre de 1997;90(8):2939-51.
97. Matthys P, Hatse S, Vermeire K, Wuyts A, Bridger G, Henson GW, et al. AMD3100, a potent and specific antagonist of the stromal cell-derived factor-1 chemokine receptor CXCR4, inhibits autoimmune joint inflammation in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 de octubre de 2001;167(8):4686-92.
98. Gianni AM. Where do we stand with respect to the use of peripheral blood progenitor cells? *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. noviembre de 1994;5(9):781-4.
99. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*. septiembre de 1984;247(3 Pt 1):C125-42.
100. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 18 de febrero de 1972;175(4023):720-31.
101. Mathews K.M, van Holde KE, Ahern KG. *Biochemistry*. Third edition. Addison Wesley; 2003 p. 363-92.
102. Alberts BJ, Julian L, Martin R, Keith W: *Molecular Biology of the Cell*. ed 4th, New York and London, Garland Publishing, 2002.
103. Darnell JL, Berk A, Zipursky SL, Matsudaria P, Baltimore D: *Molecular Cell Biology*. ed 4th, New York, W H Freeman & Co, 1999.
104. Hays LM, Crowe JH, Wolkers W, Rudenko S. Factors affecting leakage of trapped solutes from phospholipid vesicles during thermotropic phase transitions. *Cryobiology*. marzo de 2001;42(2):88-102.

## BIBLIOGRAFÍA

105. Seidel GE. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*. 7 de enero de 2006;65(1):228-35.
106. 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*. diciembre de 2000;41(4):319-23.
107. Loken SD, Demetrick DJ. A novel method for freezing and storing research tissue bank specimens. *Hum Pathol*. septiembre de 2005;36(9):977-80.
108. Simione F. y Nalge Nunc international corporation. *Cryopreservation manual*. 1998. 8p.
109. Lovelock JE. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta*. marzo de 1953;10(3):414-26.
110. Ryan J. *Cryogenic preservation and storage of animal cells*. Corning Life Sciences. 2005. Disponible en [www.corning.com/lifesciences](http://www.corning.com/lifesciences).
111. Rodríguez L: Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados: control de calidad, estabilidad osmótica y lavado de DMSO.; Director: García López J; Rutllant Bañeras M; Querol Giner S. Universitat Autònoma Barcelona, Facultat de Medicina, Departament de Medicina, 2005.
112. Valeri CR. Simplification of the methods for adding and removing glycerol during freeze-preservation of human red blood cells with the high or low glycerol methods: biochemical modification prior to freezing. *Transfusion (Paris)*. junio de 1975;15(3):195-218.
113. Day J y Stacey G. *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. *Methods in molecular biology*. 2a.ed. Estados Unidos: Humana Press Inc, 2007. 361p.
114. Baierlein R. *Thermal Physics*. Cambridge University Press; 1999. 444 p.
115. Rowley SD, Bensinger WI, Gooley TA, Buckner CD. Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation. *Blood*. 1 de mayo de 1994;83(9):2731-6.
116. Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G, Trounson AO. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Hum Reprod Oxf Engl*. octubre de 2001;16(10):2187-94.
117. Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Am J Hematol*. junio de 2007;82(6):463-72.
118. Lewis JP, Passovoy M, Conti SA, McFate PA, Trobaugh FE. The effect of cooling regimens on the transplantation potential of marrow. *Transfusion (Paris)*. febrero de 1967;7(1):17-32.

## BIBLIOGRAFÍA

119. Meryman HT, Williams RJ, Douglas MS. Freezing injury from «solution effects» and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology*. junio de 1977;14(3):287-302.
120. Ketheesan N, Whiteman C, Malczewski AB, Hirst RG, La Brooy JT. Effect of cryopreservation on the immunogenicity of umbilical cord blood cells. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis*. febrero de 2004;30(1):47-54.
121. Snyder EH. et al. *Hematopoietic Progenitor Stem Cells: A Primer for Medical Professionals: American Association of Blood Banks*, 2000.
122. Thomas ED. A history of haemopoietic cell transplantation. *Br J Haematol*. mayo de 1999;105(2):330-9.
123. Keung YK, Cobos E, Morgan D, Park M, Dixon S, Wu K, et al. High cellular concentration of peripheral blood progenitor cells during cryopreservation adversely affects CFU-GM but not hematopoietic recovery. *J Hematother*. febrero de 1996;5(1):73-7.
124. Cabezudo E, Dalmases C, Ruz M, Sanchez JA, Torrico C, Sola C, et al. Leukapheresis components may be cryopreserved at high cell concentrations without additional loss of HPC function. *Transfusion (Paris)*. octubre de 2000;40(10):1223-7.
125. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol*. noviembre de 1963;47:347-69.
126. Fahy GM. *Cryobiology: The study of life and death at low temperature*. 1986; 224:315-335 p.
127. Boiso I. *Criobiologia. Revista iberoamericana de fertilidad* 2001; 18(4).
128. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*. junio de 1977;14(3):251-72.
129. 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.
130. Meryman HT. Cryoprotective agents. *Cryobiology*. abril de 1971;8(2):173-83.
131. Karow AM, Webb WR. Tissue freezing. A theory for injury and survival. *Cryobiology*. diciembre de 1965;2(3):99-108.
132. Mazur P, Leibo SP, Chu EH. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res*. 1972;71(2):345-55.
133. Meryman HT. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology*. octubre de 1971;8(5):489-500.
134. Meryman HT. Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes. *Nature*. 27 de abril de 1968;218(5139):333-6.

## BIBLIOGRAFÍA

135. García JV, L. Criopreservadores: concepto y manejo. *Biol Clin Hematol* 1984; 6 (219).
136. Sputtek A, Kühnl and Rowe A. Cryopreservation of erythrocytes, thrombocytes and lymphocytes. *Transfus Med Hemother*. 2007;34:262-267 p.
137. Elliot CJ, Samson DM, Kanfer EJ. Quality assurance in the irradiation of blood products. *Bone Marrow Transplant*. septiembre de 1994;14(3):494.
138. Saytsoff A. Ueber die Einwirkung von Salpetersäure auf Schwefelmethyl und Schwefeläthyl ( On the effect of nitric acid on methyl sulfide and ethyl sulfide). *Ann Chem Pharm*. 1867;144:148-156.
139. Willhite CC, Katz PI. Toxicology updates. Dimethyl sulfoxide. *J Appl Toxicol JAT*. junio de 1984;4(3):155-60.
140. Galmés A, Besalduch J, Bargay J, Matamoros N, Durán MA, Morey M, et al. Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells with 5-percent dimethyl sulfoxide at -80 degrees C without rate-controlled freezing. *Transfusion (Paris)*. septiembre de 1996;36(9):794-7.
141. Stiff PJ, Murgo AJ, Zaroulis CG, DeRisi MF, Clarkson BD. Unfractionated human marrow cell cryopreservation using dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch. *Cryobiology*. febrero de 1983;20(1):17-24.
142. García JV. Criopreservadores concepto y manejo. *Biol Clin Hematol* 1984;6(219).
143. 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*. octubre de 1978;40(2):185-95.
144. Rowley SD, Anderson GL. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant*. mayo de 1993;11(5):389-93.
145. Branch DR, Calderwood S, Cecutti MA, Herst R, Solh H. Hematopoietic progenitor cells are resistant to dimethyl sulfoxide toxicity. *Transfusion (Paris)*. octubre de 1994;34(10):887-90.
146. Rodríguez L, Velasco B, García J, Martín-Henao GA. Evaluation of an automated cell processing device to reduce the dimethyl sulfoxide from hematopoietic grafts after thawing. *Transfusion (Paris)*. agosto de 2005;45(8):1391-7.
147. Hertenstein B, Stefanic M, Schmeiser T, Scholz M, Göller V, Clausen M, et al. Cardiac toxicity of bone marrow transplantation: predictive value of cardiologic evaluation before transplant. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. mayo de 1994;12(5):998-1004.
148. Keung YK, Lau S, Elkayam U, Chen SC, Douer D. Cardiac arrhythmia after infusion of cryopreserved stem cells. *Bone Marrow Transplant*. septiembre de 1994;14(3):363-7.

## BIBLIOGRAFÍA

149. Dhodapkar M, Goldberg SL, Tefferi A, Gertz MA. Reversible encephalopathy after cryopreserved peripheral blood stem cell infusion. *Am J Hematol.* febrero de 1994;45(2):187-8.
150. Bond GR, Curry SC, Dahl DW. Dimethylsulphoxide-induced encephalopathy. *Lancet.* 20 de mayo de 1989;1(8647):1134-5.
151. 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.* septiembre de 1989;74(4):1260-5.
152. Foïs E, Desmartin M, Benhamida S, Xavier F, Vanneaux V, Rea D, et al. Recovery, viability and clinical toxicity of thawed and washed haematopoietic progenitor cells: analysis of 952 autologous peripheral blood stem cell transplantations. *Bone Marrow Transplant.* noviembre de 2007;40(9):831-5.
153. Júnior AM, Arrais CA, Saboya R, Velasques RD, Junqueira PL, Dulley FL. Neurotoxicity associated with dimethylsulfoxide-preserved hematopoietic progenitor cell infusion. *Bone Marrow Transplant.* enero de 2008;41(1):95-6.
154. Ruiz-Delgado GJ, Mancías-Guerra C, Tamez-Gómez EL, Rodríguez-Romo LN, López-Otero A, Hernández-Arizpe A, et al. Dimethyl sulfoxide-induced toxicity in cord blood stem cell transplantation: report of three cases and review of the literature. *Acta Haematol.* 2009;122(1):1-5.
155. Davis JM, Rowley SD, Braine HG, Piantadosi S, Santos GW. Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. *Blood.* 1 de febrero de 1990;75(3):781-6.
156. Rowley S, MacLeod B, Heimfeld S, Holmberg L, Bensinger W. Severe central nervous system toxicity associated with the infusion of cryopreserved PBSC components. *Cytotherapy.* 1999;1(4):311-7.
157. Syme R, Bewick M, Stewart D, Porter K, Chadderton T, Glück S. The role of depletion of dimethyl sulfoxide before autografting: on hematologic recovery, side effects, and toxicity. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* febrero de 2004;10(2):135-41.
158. Ferrucci PF, Martinoni A, Cocorocchio E, Civelli M, Cinieri S, Cardinale D, et al. Evaluation of acute toxicities associated with autologous peripheral blood progenitor cell reinfusion in patients undergoing high-dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplant.* enero de 2000;25(2):173-7.
159. 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.* diciembre de 2007;40(11):1063-7.
160. Donmez A, Tombuloglu M, Gungor A, Soyer N, Saydam G, Cagirgan S. Clinical side effects during peripheral blood progenitor cell infusion. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis.* febrero de 2007;36(1):95-101.

## BIBLIOGRAFÍA

161. Essayan DM, Schilder R, Kagey-Sobotka A, Jenkins MK, Korzeniowski O, Lichtenstein LM, et al. Anaphylaxis during autologous peripheral blood progenitor cell infusion. *Bone Marrow Transplant.* abril de 1997;19(7):749-52.
162. Hirata Y, Kishino K, Onozaki F, Nakaki Y, Fujiwara S, Yamamoto C, et al. Use of cryoprotectant-depleted allogeneic peripheral blood stem cells for transplantation. *Hematol Amst Neth.* julio de 2011;16(4):221-4.
163. Konuma T, Ooi J, Takahashi S, Tomonari A, Tsukada N, Kobayashi T, et al. Cardiovascular toxicity of cryopreserved cord blood cell infusion. *Bone Marrow Transplant.* mayo de 2008;41(10):861-5.
164. Nagamura-Inoue T, Shioya M, Sugo M, Cui Y, Takahashi A, Tomita S, et al. 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 (Paris).* septiembre de 2003;43(9):1285-95.
165. Kersting S, Verdonck LF. Stem cell transplantation nephropathy: a report of six cases. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* junio de 2007;13(6):638-43.
166. Petropoulou AD, Bellochine R, Norol F, Marie J-P, Rio B. Coronary artery spasm after infusion of cryopreserved cord blood cells. *Bone Marrow Transplant.* agosto de 2007;40(4):397-8.
167. Mueller LP, Theurich S, Christopheit M, Grothe W, Muetherig A, Weber T, et al. Neurotoxicity upon infusion of dimethylsulfoxide-cryopreserved peripheral blood stem cells in patients with and without pre-existing cerebral disease. *Eur J Haematol.* junio de 2007;78(6):527-31.
168. Windrum P, Morris TCM. Severe neurotoxicity because of dimethyl sulphoxide following peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* febrero de 2003;31(4):315.
169. Zager RA. Acute renal failure in the setting of bone marrow transplantation. *Kidney Int.* noviembre de 1994;46(5):1443-58.
170. Hentschke S, Hentschke M, Hummel K, Salwender HJ, Braumann D, Stang A. Bilateral thalamic infarction after reinfusion of DMSO-preserved autologous stem-cells. *Leuk Lymphoma.* noviembre de 2006;47(11):2418-20.
171. Marcacci G, Corazzelli G, Becchimanzi C, Arcamone M, Capobianco G, Russo F, et al. DMSO-associated encephalopathy during autologous peripheral stem cell infusion: a predisposing role of preconditioning exposure to CNS-penetrating agents? *Bone Marrow Transplant.* julio de 2009;44(2):133-5.
172. Higman MA, Port JD, Beauchamp NJ, Chen AR. Reversible leukoencephalopathy associated with re-infusion of DMSO preserved stem cells. *Bone Marrow Transplant.* octubre de 2000;26(7):797-800.

## BIBLIOGRAFÍA

173. Rowley SD, Feng Z, Yadock D, Holmberg L, Macleod B, Heimfeld S. Post-thaw removal of DMSO does not completely abrogate infusional toxicity or the need for pre-infusion histamine blockade. *Cytotherapy*. 1999;1(6):439-46.
174. Hidalgo JD, Krone R, Rich MW, Blum K, Adkins D, Fan M-Y, et al. Supraventricular tachyarrhythmias after hematopoietic stem cell transplantation: incidence, risk factors and outcomes. *Bone Marrow Transplant*. octubre de 2004;34(7):615-9.
175. Zenhäusern R, Tobler A, Leoncini L, Hess OM, Ferrari P. Fatal cardiac arrhythmia after infusion of dimethyl sulfoxide-cryopreserved hematopoietic stem cells in a patient with severe primary cardiac amyloidosis and end-stage renal failure. *Ann Hematol*. septiembre de 2000;79(9):523-6.
176. Schlegel PG, Wöfl M, Schick J, Winkler B, Eyrich M. Transient loss of consciousness in pediatric recipients of dimethylsulfoxide (DMSO)-cryopreserved peripheral blood stem cells independent of morphine co-medication. *Haematologica*. octubre de 2009;94(10):1473-5.
177. Bauwens D, Hantson P, Laterre P-F, Michaux L, Latinne D, De Tourchaninoff M, et al. Recurrent seizure and sustained encephalopathy associated with dimethylsulfoxide-preserved stem cell infusion. *Leuk Lymphoma*. noviembre de 2005;46(11):1671-4.
178. Benekli M, Anderson B, Wentling D, Bernstein S, Czuczman M, McCarthy P. Severe respiratory depression after dimethylsulphoxide-containing autologous stem cell infusion in a patient with AL amyloidosis. *Bone Marrow Transplant*. junio de 2000;25(12):1299-301.
179. Zambelli A, Poggi G, Da Prada G, Pedrazzoli P, Cuomo A, Miotti D, et al. Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion. *Anticancer Res*. diciembre de 1998;18(6B):4705-8.
180. Hazar V, Gungor O, Guven AG, Aydin F, Akbas H, Gungor F, et al. Renal function after hematopoietic stem cell transplantation in children. *Pediatr Blood Cancer*. agosto de 2009;53(2):197-202.
181. Graves V, Danielson C, Abonour R, McCarthy L. How to ensure safe and welltolerated stem cell infusions. *Transfusion* 1998; 38: 30S–30S.
182. Hoyt R, Szer J, Grigg A. Neurological events associated with the infusion of cryopreserved bone marrow and/or peripheral blood progenitor cells. *Bone Marrow Transplant*. junio de 2000;25(12):1285-7.
183. Shu Z, Heimfeld S, Gao D. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. *Bone Marrow Transplant*. abril de 2014;49(4):469-76.
184. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*. 22 de mayo de 1970;168(3934):939-49.

## BIBLIOGRAFÍA

185. Au Buchon JS, RA. Marrow transplantation: Practical and technical aspects of stem cell reconstitution: American Association of Blood Banks, 1992.
186. Mavroudis D, Read E, Cottler-Fox M, Couriel D, Molldrem J, Carter C, et al. CD34+ cell dose predicts survival, posttransplant morbidity, and rate of hematologic recovery after allogeneic marrow transplants for hematologic malignancies. *Blood*. 15 de octubre de 1996;88(8):3223-9.
187. Akkök CA, Liseth K, Nesthus I, Løkeland T, Tefre K, Bruserud O, et al. Autologous peripheral blood progenitor cells cryopreserved with 5 and 10 percent dimethyl sulfoxide alone give comparable hematopoietic reconstitution after transplantation. *Transfusion (Paris)*. mayo de 2008;48(5):877-83.
188. Abrahamsen JF, Bakken AM, Bruserud Ø. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells with 5-percent rather than 10-percent DMSO results in less apoptosis and necrosis in CD34+ cells. *Transfusion (Paris)*. diciembre de 2002;42(12):1573-80.
189. 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*. junio de 2003;12(3):351-8.
190. Liseth K, Abrahamsen JF, Bjørsvik S, Grøtnebø K, Bruserud Ø. The viability of cryopreserved PBPC depends on the DMSO concentration and the concentration of nucleated cells in the graft. *Cytotherapy*. 2005;7(4):328-33.
191. Rowley SD, Feng Z, Chen L, Holmberg L, Heimfeld S, MacLeod B, et al. A randomized phase III clinical trial of autologous blood stem cell transplantation comparing cryopreservation using dimethylsulfoxide vs dimethylsulfoxide with hydroxyethylstarch. *Bone Marrow Transplant*. junio de 2003;31(11):1043-51.
192. Dazey B, Duchez P, Letellier C, Vezon G, Ivanovic Z, French Cord Blood Network. Cord blood processing by using a standard manual technique and automated closed system «Sepax» (Kit CS-530). *Stem Cells Dev*. febrero de 2005;14(1):6-10.
193. Sowemimo-Coker SO, Andrade F, Kim A, Pesci S. A simple filtration system for red blood cell depletion and volume reduction in routine processing of human umbilical cord blood. *Vox Sang*. febrero de 2009;96(2):138-45.
194. Koliakos G, Alamdari DH, Tsagias N, Kouzi-Koliakos K, Michaloudi E, Karagiannis V. A novel high-yield volume-reduction method for the cryopreservation of UC blood units. *Cytotherapy*. 2007;9(7):654-9.
195. Selves P, Mirabet V, Planelles D, Blasco I, Perales A, Carbonell-Uberos F, et al. Red blood cell depletion with a semiautomated system or hydroxyethyl starch sedimentation for routine cord blood banking: a comparative study. *Transfusion (Paris)*. junio de 2005;45(6):867-73.
196. Zinno F, Landi F, Scerpa MC, Aureli V, Lanti A, Ceccarelli S, et al. Processing of hematopoietic stem cells from peripheral blood before cryopreservation: use of a closed automated system. *Transfusion (Paris)*. diciembre de 2011;51(12):2656-63.

## BIBLIOGRAFÍA

197. Akkök CA, Holte MR, Tangen JM, Ostenstad B, Bruserud O. Hematopoietic engraftment of dimethyl sulfoxide-depleted autologous peripheral blood progenitor cells. *Transfusion (Paris)*. febrero de 2009;49(2):354-61.
198. 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 (Paris)*. diciembre de 2005;45(12):1909-16.
199. Beaujean F, Hartmann O, Kuentz M, Le Forestier C, Divine M, Duedari N. A simple, efficient washing procedure for cryopreserved human hematopoietic stem cells prior to reinfusion. *Bone Marrow Transplant*. octubre de 1991;8(4):291-4.
200. Calmels B, Houzé P, Hengesse J-C, 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*. mayo de 2003;31(9):823-8.
201. Perotti CG, Del Fante C, Viarengo G, Papa P, Rocchi L, Bergamaschi P, et al. A new automated cell washer device for thawed cord blood units. *Transfusion (Paris)*. junio de 2004;44(6):900-6.
202. Rodríguez L, Azqueta C, Azzalin S, García J, Querol S. Washing of cord blood grafts after thawing: high cell recovery using an automated and closed system. *Vox Sang*. octubre de 2004;87(3):165-72.
203. Scerpa MC, Daniele N, Landi F, Caniglia M, Cometa AM, Ciammetti C, et al. Automated washing of human progenitor cells: evaluation of apoptosis and cell necrosis. *Transfus Med Oxf Engl*. diciembre de 2011;21(6):402-7.
204. Meehan KR, Areman EM, Ericson SG, Matias C, Seifeldin R, Schulman K. Mobilization, collection, and processing of autologous peripheral blood stem cells: development of a clinical process with associated costs. *J Hematother Stem Cell Res*. octubre de 2000;9(5):767-71.
205. Carreras E, Rozman C: Trasplante de progenitores hematopoyéticos; en Sans-Sabrafen J, Besses C, Vives JL, (eds): *Hematología Clínica*. Madrid, Elsevier España, S.A., 2006, pp789-807. En.
206. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. octubre de 2009;15(10):1143-238.
207. Baron JF, Coste C. Los coloides sintéticos. En: Baron JF, Reyes C. *Técnicas de ahorro de sangre*. 1 ed. Argentina: Talleres Gráficos de la Ley SAE el, 1997:263-74.
208. Nicholson JP, Wolmarans MR, Park GR. The role of albumin in critical illness. *Br J Anaesth*. octubre de 2000;85(4):599-610.
209. Ragaller MJ, Theilen H, Koch T. Volume replacement in critically ill patients with acute renal failure. *J Am Soc Nephrol JASN*. febrero de 2001;12 Suppl 17:S33-9.

## BIBLIOGRAFÍA

210. Ibsen LM, Bratton SL, Goldstein B. Decisions points in the management of pediatric septic shock. *Seminari Pediatr Infect Dis* 2000;11(1):43-52.
211. McCunn M, Karlin A. Nonblood fluid resuscitation. More questions than answers. *Anesthesiology Clin North Am* 1999;17(1):107-23.
212. Mollison PL, Engelfield CP, Contreras M. *Blood Transfusion in Clinical Medicine* 10E. 10 edition. Oxford: Wiley-Blackwell; 1997. 754 p.
213. Fresenius Kabi Argentina [Internet]. [citado 12 de junio de 2015]. Recuperado a partir de: [http://www.fresenius-kabi.com.ar/productos\\_voluven\\_caracteristicas.php](http://www.fresenius-kabi.com.ar/productos_voluven_caracteristicas.php)
214. Leynadier F, Wessel F. [Skin tests for diagnosis of hypersensitivity to colloidal plasma substitutes]. *Ann Fr Anesthésie Réanimation*. mayo de 2002;21 Suppl 1:121s - 122s.
215. Carbohidratos o Glúcidos - Estructura Química (Página 2 de 3) [Internet]. [citado 12 de junio de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.scientificpsyhic.com/fitness/carbohidratos1.html>
216. Celik I, Duda D, Stinner B, Kimura K, Gajek H, Lorenz W. Early and late histamine release induced by albumin, hetastarch and polygeline: some unexpected findings. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al*. octubre de 2003;52(10):408-16.
217. Stolzing A, Naaldijk Y, Fedorova V, Sethe S. Hydroxyethylstarch in cryopreservation - mechanisms, benefits and problems. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis*. abril de 2012;46(2):137-47.
218. Huang Y-Z, Shen J-L, Yang P-D, Wu N-H, Tang X-F, Gong L-Z, et al. [Comparison of different cryopreservation systems for peripheral blood stem cells]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi Zhongguo Yingyong Shenglixue Zazhi Chin J Appl Physiol*. febrero de 2008;24(1):125-8.
219. Corbin F, Cullis HM, Freireich EJ . Development of apheresis instrumentation in McLeod BC, Price Th and Drew MJ Eds. *Apheresis: Principles and Practices*. Bethesda, MD. AABB Press 1997.
220. Decot V, Houzé P, Stoltz J-F, Bensoussan D. Quantification of residual dimethylsulfoxide after washing cryopreserved stem cells and thawing tissue grafts. *Biomed Mater Eng*. 2009;19(4-5):293-300.
221. Reich-Slotky R, Bachegowda LS, Ancharski M, Mendeleyeva L, Rubinstein P, Rennert H, et al. How we handled the dextran shortage: an alternative washing or dilution solution for cord blood infusions. *Transfusion (Paris)*. 5 de febrero de 2015;
222. Sheridan WP. Transplantation of mobilized peripheral blood stem cells: role of filgrastim. *J Hematother*. 1994;3(4):349-52.
223. Nadler SB, Hidalgo JH, Bloch T. Prediction of blood volume in normal human adults. *Surgery*. febrero de 1962;51(2):224-32.

## BIBLIOGRAFÍA

224. Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 8 de mayo de 2003;348(19):1875-83.
225. 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*. 1 de octubre de 1992;80(7):1666-72.
226. Rebibou JM, Caillot D, Casasnovas RO, Tanter Y, Maillard N, Solary E, et al. Peripheral blood stem cell transplantation in a multiple myeloma patient with end-stage renal failure. *Bone Marrow Transplant*. julio de 1997;20(1):63-5.
227. Dispenzieri A, Rajkumar SV, Gertz MA, Fonseca R, Lacy MQ, Bergsagel PL, et al. Treatment of newly diagnosed multiple myeloma based on Mayo Stratification of Myeloma and Risk-adapted Therapy (mSMART): consensus statement. *Mayo Clin Proc*. marzo de 2007;82(3):323-41.
228. Trasplante autólogo de sangre periférica en pacientes con Mieloma Múltiple tras acondicionamiento con Busulfan intravenoso y Melfalan. *GETH*. Versión: Mayo 2005.
229. Kebriaei P, Madden T, Kazerooni R, Wang X, Thall PF, Ledesma C, et al. 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 J Am Soc Blood Marrow Transplant*. marzo de 2011;17(3):412-20.
230. Chopra R, McMillan AK, Linch DC, Yuklea S, Taghipour G, Pearce R, et al. 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*. 1 de marzo de 1993;81(5):1137-45.
231. Gaspard MH, Maraninchi D, Stoppa AM, Gastaut JA, Michel G, Tubiana N, et al. 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(3):256-62.
232. Shaw PJ, Bergin ME, Burgess MA, Dalla Pozza L, Kellie SJ, Rowell G, et al. Childhood acute myeloid leukemia: outcome in a single center using chemotherapy and consolidation with busulfan/cyclophosphamide for bone marrow transplantation. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. octubre de 1994;12(10):2138-45.
233. Santos GW. Busulfan (Bu) and cyclophosphamide (Cy) for marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. enero de 1989;4 Suppl 1:236-9.
234. Protocolo asistencial para el tratamiento de primera línea adaptado al riesgo de la Leucemia Mieloblástica aguda en pacientes de edad menor o igual a 65 años. Versión 22-03-2011.

## BIBLIOGRAFÍA

235. Petersen FB, Deeg HJ, Buckner CD, Appelbaum FR, Storb R, Clift RA, et al. Marrow transplantation following escalating doses of fractionated total body irradiation and cyclophosphamide--a phase I trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1992;23(5):1027-32.
236. Tratamiento del Linfoma Cerebral Primario en pacientes sin inmunodeficiencia. Guía clínica asistencial GELTAMO. Grupo de Linfomas Agresivos. Versión Dic-2008.
237. Burt RK, Loh Y, Cohen B, Stefoski D, Stefosky D, Balabanov R, et al. Autologous non-myeloablative haemopoietic stem cell transplantation in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase I/II study. *Lancet Neurol.* marzo de 2009;8(3):244-53.
238. Gill P, Litzow M, Buckner J, Arndt C, Moynihan T, Christianson T, et al. High-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation in adults with recurrent embryonal tumors of the central nervous system. *Cancer.* 15 de abril de 2008;112(8):1805-11.
239. 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.* diciembre de 1999;24(11):1157-9.
240. Randomized Study of Consolidation Chemotherapy versus High-Dose Chemotherapy followed by Autologous Stem Cell Transplant for Children with High-Risk Recurrent Wilms Tumor. Marcio H. Malogolowkin, MD; François Pein, MD. Versión 03/13/05.
241. Pedrazzoli P, Ledermann JA, Lotz J-P, Leyvraz S, Aglietta M, Rosti G, et al. High dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem cell support for solid tumors other than breast cancer in adults. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* octubre de 2006;17(10):1479-88.
242. Kleiner S, Kirsch A, Schwaner I, Kingreen D, Schwella N, Huhn D, et al. High-dose chemotherapy with carboplatin, etoposide and ifosfamide followed by autologous stem cell rescue in patients with relapsed or refractory malignant lymphomas: a phase I/II study. *Bone Marrow Transplant.* diciembre de 1997;20(11):953-9.
243. Bacigalupo A, Socie' G, Lanino E, Prete A, Locatelli F, Locasciulli A, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, antithymocyte globulin, with or without low dose total body irradiation, for alternative donor transplants, in acquired severe aplastic anemia: a retrospective study from the EBMT-SAA Working Party. *Haematologica.* junio de 2010;95(6):976-82.
244. Khouri IF, Albitar M, Saliba RM, Ippoliti C, Ma YC, Keating MJ, et al. Low-dose alemtuzumab (Campath) in myeloablative allogeneic stem cell transplantation for CD52-positive malignancies: decreased incidence of acute graft-versus-host-disease with unique pharmacokinetics. *Bone Marrow Transplant.* abril de 2004;33(8):833-7.
245. Tullis JL, Surgenor DM, Tinch R, D'Hont M, Gilchrist FL, Driscoll S, et al. New principle of closed system centrifugation. 1956. *Ther Apher Off J Int Soc Apher Jpn Soc Apher.* abril de 2000;4(2):73-80.

## BIBLIOGRAFÍA

246. Judson G, Jones A, Kellogg R, Buckner D, Eisel R, Perry S, et al. Closed continuous-flow centrifuge. *Nature*. 2 de marzo de 1968;217(5131):816-8.
247. Jones AL. The IBM Blood Cell Separator and Blood Cell Processor: a personal perspective. *J Clin Apheresis*. 1988;4(4):171-82.
248. Hester JP, Kellogg RM, Mulzet AP, Kruger VR, McCredie KB, Freireich EJ. Principles of blood separation and component extraction in a disposable continuous-flow single-stage channel. *Blood*. julio de 1979;54(1):254-68.
249. Wu F, Heng KK, Salleh RB, Soh TG, Lee JJ, Mah J, et al. Comparing peripheral blood stem cell collection using the COBE Spectra, Haemonetics MCS+, and Baxter Amicus. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis*. diciembre de 2012;47(3):345-50.
250. Bain BJ, Lewis SM, Bates I. Basic haematological techniques. In Dacie and Lewis practical haematology, Lewis SM, Bain BJ and Bates I. 5th edition, Churchill Livingstone; Philadelphia, PA, USA. 2006; 26-57.
251. Coulter WH. High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. *Proc. Natl Electronics Conf* 1958; 12:1034-1042.
252. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem*. agosto de 2000;46(8 Pt 2):1221-9.
253. B. Orfao A, González de Buitrago, JM. La citometría de flujo en el laboratorio clínico. *Monografías del Comité de Publicaciones de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular*, noviembre de 1995.
254. Escalante G. Manual de Citometría de flujo. Guatemala: Instituto Guatemalteco de Seguridad Social, Doc. Tec. Marzo, 2006. 76p. (p 1-12).
255. Goodwin HS, Grunzinger LM, Regan DM, McCormick KA, Johnson CE, Oliver DA, et al. Long term cryostorage of UC blood units: ability of the integral segment to confirm both identity and hematopoietic potential. *Cytotherapy*. 2003;5(1):80-6.
256. Humpe A, Riggert J, Vehmeyer K, Troff C, Hiddemann W, Köhler M, et al. 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 (Paris)*. octubre de 1997;37(10):1050-7.
257. Yang H, Acker JP, Cabuhat M, McGann LE. Effects of incubation temperature and time after thawing on viability assessment of peripheral hematopoietic progenitor cells cryopreserved for transplantation. *Bone Marrow Transplant*. noviembre de 2003;32(10):1021-6.
258. Ferrebee JW, Billen D, Urso IM, Lu WC, Thomas ED, Congdon CC. Preservation of radiation recovery factor in frozen marrow. *Blood*. diciembre de 1957;12(12):1096-100.

## BIBLIOGRAFÍA

259. Donnenberg AD, Koch EK, Griffin DL, Stanczak HM, Kiss JE, Carlos TM, et al. Viability of cryopreserved BM progenitor cells stored for more than a decade. *Cytotherapy*. 2002;4(2):157-63.
260. Goodman JW, Hodgson GS. Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood*. junio de 1962;19:702-14.
261. Körbling 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*. julio de 1981;9(6):684-90.
262. Sauer-Heilborn A, Kadidlo D, McCullough J. Patient care during infusion of hematopoietic progenitor cells. *Transfusion (Paris)*. junio de 2004;44(6):907-16.
263. Oziel-Taieb S, Faucher-Barbey C, Chabannon C, Ladaique P, Saux P, Gouin F, et al. Early and fatal immune haemolysis after so-called «minor» ABO-incompatible peripheral blood stem cell allotransplantation. *Bone Marrow Transplant*. junio de 1997;19(11):1155-6.
264. Calmels B, Lemarié C, Esterni B, Malugani C, Charbonnier A, Coso D, et al. Occurrence and severity of adverse events after autologous hematopoietic progenitor cell infusion are related to the amount of granulocytes in the apheresis product. *Transfusion (Paris)*. julio de 2007;47(7):1268-75.
265. Milone G, Mercurio S, Strano A, Leotta S, Pinto V, Battiato K, et al. Adverse events after infusions of cryopreserved hematopoietic stem cells depend on non-mononuclear cells in the infused suspension and patient age. *Cytotherapy*. 2007;9(4):348-55.
266. Pal R, Mamidi MK, Das AK, Bhonde R. Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells. *Arch Toxicol*. abril de 2012;86(4):651-61.
267. Cavas M, Beltrán D, Navarro JF. Behavioural effects of dimethyl sulfoxide (DMSO): changes in sleep architecture in rats. *Toxicol Lett*. 4 de julio de 2005;157(3):221-32.
268. Zyuz'kov GN, Gur'yantseva LA, Simanina EV, Zhdanov VV, Dygai AM, Goldberg ED. Effect of dimethylsulfoxide on the functions of mesenchymal and hemopoietic precursors. *Bull Exp Biol Med*. abril de 2007;143(4):535-8.
269. Hegner B, Weber M, Dragun D, Schulze-Lohoff E. Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Hypertens*. junio de 2005;23(6):1191-202.
270. Gao DY, Liu J, Liu C, McGann LE, Watson PF, Kleinhans FW, et al. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum Reprod Oxf Engl*. mayo de 1995;10(5):1109-22.
271. Zhou X, Gao F, Shu Z, Chung J-H, Heimfeld S, Gao D. Theoretical and experimental analyses of optimal experimental design for determination of hydraulic

## BIBLIOGRAFÍA

conductivity of cell membrane. *Biopreservation Biobanking*. septiembre de 2010;8(3):147-52.

272. 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*. febrero de 1996;81(1):59-61.

273. Sánchez Salinas A. Estudio de la eficacia y seguridad del lavado de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica criopreservados mediante un sistema cerrado y automatizado para trasplantes autólogos. [Internet]. 2013 [citado 14 de septiembre de 2015]. Recuperado a partir de: <https://digitum.um.es/xmlui/handle/10201/35417>

274. <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/ucm358271.htm>.

275. Perner A, Haase N, Guttormsen AB, Tenhunen J, Klemenzson G, Åneman A, et al. Hydroxyethyl starch 130/0.42 versus Ringer's acetate in severe sepsis. *N Engl J Med*. 12 de julio de 2012;367(2):124-34.

276. Brunkhorst FM, Engel C, Bloos F, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weiler N, et al. Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. *N Engl J Med*. 10 de enero de 2008;358(2):125-39.

277. Myburgh JA, Finfer S, Bellomo R, Billot L, Cass A, Gattas D, et al. Hydroxyethyl starch or saline for fluid resuscitation in intensive care. *N Engl J Med*. 15 de noviembre de 2012;367(20):1901-11.

278. Beaujean F, Bourhis JH, Bayle C, Jouault H, Divine M, Rieux C, et al. Successful cryopreservation of purified autologous CD34+ cells: influence of freezing parameters on cell recovery and engraftment. *Bone Marrow Transplant*. diciembre de 1998;22(11):1091-6.

279. Ayello J, Hesdorffer C, Reiss RF. A semiautomated technique for volume reduction of stem cell suspensions for autotransplantation. *J Hematother*. diciembre de 1995;4(6):545-9.

280. Solves P, Mirabet V, Roig R. Volume reduction in routine cord blood banking. *Curr Stem Cell Res Ther*. diciembre de 2010;5(4):362-6.

281. Lapierre V, Pellegrini N, Bardey I, Malugani C, Saas P, Garnache F, et al. Cord blood volume reduction using an automated system (Sepax) vs. a semi-automated system (Optipress II) and a manual method (hydroxyethyl starch sedimentation) for routine cord blood banking: a comparative study. *Cytotherapy*. 2007;9(2):165-9.

282. Kawano Y, Lee CL, Watanabe T, Abe T, Suzuya H, Okamoto Y, et al. Cryopreservation of mobilized blood stem cells at a higher cell concentration without the use of a programmed freezer. *Ann Hematol*. enero de 2004;83(1):50-4.

283. Villalón L, Odriozola J, Ramos P, Ramos ML, Herrera P, de Oteyza JP. Cryopreserving with increased cellular concentrations of peripheral blood progenitor cells: clinical results. *Haematologica*. febrero de 2002;87(2):ELT06.

## BIBLIOGRAFÍA

284. Gluckman E. Hematopoietic stem-cell transplants using umbilical-cord blood. *N Engl J Med.* 14 de junio de 2001;344(24):1860-1.
285. Valeri CR, Pivacek LE. Effects of the temperature, the duration of frozen storage, and the freezing container on in vitro measurements in human peripheral blood mononuclear cells. *Transfusion (Paris).* abril de 1996;36(4):303-8.
286. Cilloni D, Garau D, Regazzi E, Sammarelli G, Savoldo B, Caramatti C, et al. Primitive hematopoietic progenitors within mobilized blood are spared by uncontrolled rate freezing. *Bone Marrow Transplant.* marzo de 1999;23(5):497-503.
287. Katayama Y, Yano T, Bessho A, Deguchi S, Sunami K, Mahmut N, et al. The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant.* febrero de 1997;19(3):283-7.
288. Halle P, Tournilhac O, Knopinska-Posluszny W, Kanold J, Gembara P, Boiret N, et al. Uncontrolled-rate freezing and storage at -80 degrees C, with only 3.5-percent DMSO in cryoprotective solution for 109 autologous peripheral blood progenitor cell transplantations. *Transfusion (Paris).* mayo de 2001;41(5):667-73.
289. Buchanan SS, Gross SA, Acker JP, Toner M, Carpenter JF, Pyatt DW. Cryopreservation of stem cells using trehalose: evaluation of the method using a human hematopoietic cell line. *Stem Cells Dev.* junio de 2004;13(3):295-305.
290. 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.* abril de 2000;9(2):161-73.
291. Sasnoor LM, Kale VP, Limaye LS. Supplementation of conventional freezing medium with a combination of catalase and trehalose results in better protection of surface molecules and functionality of hematopoietic cells. *J Hematother Stem Cell Res.* octubre de 2003;12(5):553-64.
292. Sum AK, Faller R, de Pablo JJ. Molecular simulation study of phospholipid bilayers and insights of the interactions with disaccharides. *Biophys J.* noviembre de 2003;85(5):2830-44.
293. Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, Tsvetkova N, Wolkers W, Tablin F. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology.* septiembre de 2001;43(2):89-105.
294. Crowe JH, Crowe LM. Preservation of mammalian cells-learning nature's tricks. *Nat Biotechnol.* febrero de 2000;18(2):145-6.
295. Stroh C, Cassens U, Samraj AK, Sibrowski W, Schulze-Osthoff K, Los M. The role of caspases in cryoinjury: caspase inhibition strongly improves the recovery of cryopreserved hematopoietic and other cells. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* octubre de 2002;16(12):1651-3.

## BIBLIOGRAFÍA

296. Shlebak AA, Marley SB, Roberts IA, Davidson RJ, Goldman JM, Gordon MY. Optimal timing for processing and cryopreservation of umbilical cord haematopoietic stem cells for clinical transplantation. *Bone Marrow Transplant.* enero de 1999;23(2):131-6.
297. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med.* 18 de julio de 1996;335(3):157-66.
298. Zingsem J, Strasser E, Weisbach V, Zimmermann R, Ringwald J, Goecke T, et al. Cord blood processing with an automated and functionally closed system. *Transfusion (Paris).* junio de 2003;43(6):806-13.
299. A semiautomated technique for volume reduction of stem cell suspensions for autotransplantation. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 25 de agosto de 2015]. Recuperado a partir de:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ayello+J%2C+Hesdorffer+C%2C+Reiss+R+F.+A+semiautomated+technique+for+volume+reduction+of+stem+cell+suspensions+for+auto+transplantation>
300. Shpall EJ, LeMaistre CF, Holland K, Ball E, Jones RB, Saral R, et al. 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.* 1 de diciembre de 1997;90(11):4313-20.
301. Fleming KK, Longmire EK, Hubel A. Numerical characterization of diffusion-based extraction in cell-laden flow through a microfluidic channel. *J Biomech Eng.* octubre de 2007;129(5):703-11.
302. Fleming Glass KK, Longmire EK, Hubel A. OPTIMIZATION OF A MICROFLUIDIC DEVICE FOR DIFFUSION-BASED EXTRACTION OF DMSO FROM A CELL SUSPENSION. *Int J Heat Mass Transf.* noviembre de 2008;51(23-24):5749-57.
303. Ding W, Zhou X, Heimfeld S, Reems J-A, Gao D. A steady-state mass transfer model of removing CPAs from cryopreserved blood with hollow fiber modules. *J Biomech Eng.* enero de 2010;132(1):011002.
304. Zhou X, Liu Z, Shu Z, Ding W, Du P, Chung J, et al. A dilution-filtration system for removing cryoprotective agents. *J Biomech Eng.* febrero de 2011;133(2):021007.
305. Reich-Slotky R, Colovai AI, Semidei-Pomales M, Patel N, Cairo M, Jhang J, et al. Determining post-thaw CD34+ cell dose of cryopreserved haematopoietic progenitor cells demonstrates high recovery and confirms their integrity. *Vox Sang.* mayo de 2008;94(4):351-7.
306. Douay L, Gorin NC, Mary JY, Lemarie E, Lopez M, Najman A, et al. Recovery of CFU-GM from cryopreserved marrow and in vivo evaluation after autologous bone marrow transplantation are predictive of engraftment. *Exp Hematol.* junio de 1986;14(5):358-65.

## BIBLIOGRAFÍA

307. Aglietta M, Piacibello W, Stacchini A, Sanavio F, Novarino A, Grazia G, et al. Differences in the in vitro growth pattern of fresh and cryopreserved granulo-monopoietic precursors. *Cryobiology*. octubre de 1984;21(5):486-90.
308. Gray JL, Robinson WA. In vitro colony formation by human bone marrow cells after freezing. *J Lab Clin Med*. febrero de 1973;81(2):317-22.
309. Wells JR, Ho WG, Graze P, Sullivan A, Gale RP, Cline MJ. Isolation, cryopreservation, and autotransplantation of human stem cells. *Exp Hematol*. 1979;7 Suppl 5:12-20.
310. Spitzer G, Verma DS, Fisher R, Zander A, Vellekoop L, Litam J, et al. The myeloid progenitor cell--its value in predicting hematopoietic recovery after autologous bone marrow transplantation. *Blood*. febrero de 1980;55(2):317-23.
311. Sutherland HJ, Eaves CJ, Lansdorp PM, Phillips GL, Hogge DE. Kinetics of committed and primitive blood progenitor mobilization after chemotherapy and growth factor treatment and their use in autotransplants. *Blood*. 15 de junio de 1994;83(12):3808-14.
312. Rowley SD, Zuehlsdorf M, Braine HG, Colvin OM, Davis J, Jones RJ, et al. CFU-GM content of bone marrow graft correlates with time to hematologic reconstitution following autologous bone marrow transplantation with 4-hydroperoxycyclophosphamide-purged bone marrow. *Blood*. julio de 1987;70(1):271-5.
313. Beck C, Nguyen XD, Klüter H, Eichler H. Effect of recombinant human deoxyribonuclease on the expression of cell adhesion molecules of thawed and processed cord blood hematopoietic progenitors. *Eur J Haematol*. marzo de 2003;70(3):136-42.
314. Trébédén-Negre H, Rosenzweig M, Tanguy M-L, Lefrere F, Azar N, Heshmati F, et al. Delayed recovery after autologous peripheral hematopoietic cell transplantation: potential effect of a high number of total nucleated cells in the graft. *Transfusion (Paris)*. diciembre de 2010;50(12):2649-59.
315. FDA. Current good tissue practice for manufacturers of human cellular tissue based products. Inspection and enforcement; Proposed rule. 2001. Available at [www.access.gpo.gov/su\\_docs/aces140.html](http://www.access.gpo.gov/su_docs/aces140.html).
316. Jestice HK, Farrington M, Hunt C, Matthews I, Scott MA, Foreman J, et al. Bacterial contamination of peripheral blood progenitor cells for transplantation. *Transfus Med Oxf Engl*. junio de 1996;6(2):103-10.
317. Padley D, Koontz F, Trigg ME, Gingrich R, Strauss RG. Bacterial contamination rates following processing of bone marrow and peripheral blood progenitor cell preparations. *Transfusion (Paris)*. enero de 1996;36(1):53-6.
318. Espinosa MT, Fox R, Creger RJ, Lazarus HM. Microbiologic contamination of peripheral blood progenitor cells collected for hematopoietic cell transplantation. *Transfusion (Paris)*. septiembre de 1996;36(9):789-93.

## BIBLIOGRAFÍA

319. Webb IJ, Coral FS, Andersen JW, Elias AD, Finberg RW, Nadler LM, et al. Sources and sequelae of bacterial contamination of hematopoietic stem cell components: implications for the safety of hematotherapy and graft engineering. *Transfusion (Paris)*. septiembre de 1996;36(9):782-8.
320. Schwella N, Zimmermann R, Heuft HG, Blasczyk R, Beyer J, Rick O, et al. Microbiologic contamination of peripheral blood stem cell autografts. *Vox Sang*. 1994;67(1):32-5.
321. Prince HM, Page SR, Keating A, Saragosa RF, Vukovic NM, Imrie KR, et al. Microbial contamination of harvested bone marrow and peripheral blood. *Bone Marrow Transplant*. enero de 1995;15(1):87-91.
322. Attarian H, Feng Z, Buckner CD, MacLeod B, Rowley SD. Long-term cryopreservation of bone marrow for autologous transplantation. *Bone Marrow Transplant*. marzo de 1996;17(3):425-30.
323. Kipp F, Linnemann E, Fischer R-J, Sibrowski W, Cassens U. Cryopreservation reduces the concentration of detectable bacteria in contaminated peripheral blood progenitor cell products. *Transfusion (Paris)*. julio de 2004;44(7):1098-103.

## BIBLIOGRAFÍA



ANEXO

**ANEXO**



**APORTACIÓN DE TRABAJOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS**

1. **WASHING OF HEMATOPOIETIC PROGENITORS FOR DMSO REMOVAL BEFORE TRANSPLANT. COMPARISON OF TWO SOLUTIONS.** Catalina Cava, Miguel Blanquer Blanquer, Andrés Sánchez Salinas, Valentín Cabañas, Jorge Monserrat, Francesca Labbadia, José María Moraleda 19<sup>th</sup> Congreso de la Asociación Europea de Hematología (EHA). Milan (Italia) Del 12 al 15 Junio de 2014.
2. **AUTOMATED DMSO REMOVAL FOR CRYOPRESERVED PERIPHERAL BLOOD HEMATOPOIETIC PROGENITORS WITH SEPAX. COMPARISON OF TWO DIFFERENT WASHING SOLUTIONS.** Catalina Cava, Miguel Blanquer, Ana María García-Hernández, María Juliana Majado, Pilar Menchón, Ana Marín, Jorge Monserrat, Andrés Sánchez-Salinas, José María Moraleda. 41<sup>st</sup> Reunión anual de la Sociedad Europea de Trasplante de Sangre y Médula ósea (EBMT) Estambul (Turquía). Del 22 al 25 Marzo de 2015
3. **HEMATOPOIETIC PROGENITORS CRYOPRESERVATION DELETERIOUS EFFECTS ARE NOT ENWORSENERD BY AN AUTOMATIC WASHING WITH EITHER VOLUVEN® OR NORMAL SALINE PLUS ALBUMIN** Catalina Cava, Miguel Blanquer, Ana García-Hernández, Salvador Ruiz de Maya, María Juliana Majado, Pilar Menchon, Pilar Martínez-Avilés, Assumpta Ferrer, Andrés Sánchez-Salinas, Jose María Moraleda. Reunión Regional de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT Europe). Sevilla (España). Del 24 al 26 Septiembre de 2015.
4. **COMPARACIÓN DE DOS SOLUCIONES DE LAVADO PARA LA ELIMINACIÓN DEL DIMETIL SULFÓXIDO CONTENIDO EN LOS PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DE SANGRE PERIFÉRICA CRIOPRESERVADOS.** Catalina Cava, Miguel Blanquer, Ana María García-Hernández, María Juliana Majado, Pilar Menchón, Ana Marín, Jorge Monserrat, Andrés Sánchez-Salinas, José María Moraleda "LVII Congreso Nacional de la SEHH y del XXXI Congreso Nacional de la SETH" Valencia (España). Del 22 al 24 Octubre de 2015)