



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Impacto Clínico de la Distribución de las Poblaciones
Linfocitarias en el Inóculo y en Sangre Periférica
Post-Trasplante Alogénico de Progenitores
Hematopoyéticos**

D^a Julia Muñoz Ballester

2019

UNIVERSIDAD DE
MURCIA



**Impacto Clínico de la Distribución de las Poblaciones Linfocitarias en el Inóculo y en Sangre
Periférica Post-Trasplante Alogénico de Progenitores Hematopoyéticos**

Memoria presentada por

Julia Muñoz Ballester

Para optar al grado de

Doctora en Medicina

Tesis realizada bajo la dirección del **Dr. Andrés Jerez Cayuela**, la **Dra. María Luisa Lozano Almela**, la **Dra. Cristina Castilla Llorente** y la tutoría de la **Dra. Vanessa Roldán Schilling**

A mis padres y a mi hermano

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Me gustaría mostrar mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible este trabajo y que me han apoyado en esta etapa.

En primer lugar, al Dr. Vicente Vicente, por haberme animado a dar mis primeros pasos en el mundo de la investigación y continuar con esta tesis doctoral. A la Dra. Inmaculada Heras cuyo trabajo y dedicación motivaron mi interés por el mundo del trasplante.

A mi tutora, Vanessa Roldán, por su cercanía, apoyo y confianza.

A mis directores de tesis, Andrés Jerez, María Luisa Lozano y Cristina Castilla, por confiar en mí para este proyecto y hacer que finalmente llegue a buen puerto. Especialmente a Andrés, gracias por tu paciencia, dedicación y por guiarme durante todo el proceso.

A Tzu Chen, por su gran ayuda a lo largo de todos estos años. Mil gracias.

A todos los compañeros del Servicio de Hematología y Oncología del Hospital Morales Meseguer, Reina Sofía y Centro regional de Hemodonación ya que mis conocimientos y logros como hematóloga son en gran parte gracias a ellos. En especial, gracias a todos los residentes y amigos con los que tuve el placer de coincidir (Shirley, Manuel, Tzu, María, Ana, Renato, Pepa, Alejandra, Silvina, Antonio, Laura, Cristina, Miriam...), ya que hicieron que unos años duros no lo fueran tanto. A José Gálvez, siempre con los brazos abiertos para animarme y a Oriana y las tardes de jóvenes investigadoras. También a Fernando y Lola a cuyos caramelos tuve que acudir más de una tarde de recogida de datos.

Quiero agradecer su acogida a los que han sido mis compañeros estos últimos dos años, el equipo de hematología y análisis clínico del Hospital Vega Baja de Orihuela y a mis compañeros del Hospital Virgen de las Nieves de Granada.

A nivel personal, a mis amigas: Marisabell y Nataly, que desde el primer día nos convertimos en ese trío inseparable, el simple hecho de haberos conocido hizo que todo mereciera la pena. Bea, M.Mar, Mavi, María (jumilla) y Ana Rodríguez, compañeras de inicio en la medicina y amigas hasta el final. Y a mis amigas de siempre, María Pardo, Elena, Marta Luengo, Marta Calero y Ana Cano porque el tiempo y la distancia no pasa por nosotras.

Muy especialmente a toda mi familia. Mis padres, Isa y Quique, mi hermano Quique y Mari, gracias por enseñarme a caminar por la vida, creer en mí y acompañarme en todas mis decisiones. Y no puedo olvidar a mis abuelas cuya alegría, fortaleza y amor incondicional siempre llevaré conmigo. Todo lo que soy os lo debo a vosotros.

Finalmente, a Alberto y el gran equipo que hemos formado. Por apoyarme, ser paciente, incluso en los últimos momentos de esta tesis, y animarme a crecer y seguir adelante.

Gracias.

ÍNDICE GENERAL

Índice general

Abreviaturas.....	17
Lista de figuras y tablas	25
Resumen	32
1. Introducción.....	37
1.1. Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.	39
1.2. Reconstitución inmune tras alo-TPH	44
1.3. Expansiones persistentes de linfocitos T citotóxicos tras alo-TPH	50
1.4. Mutaciones en <i>STAT3</i> y <i>STAT5b</i> en la patogénesis de la leucemia de linfocitos grandes granulares.	54
1.5. Proceso de aféresis de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica.	59
1.6. Impacto clínico de la distribución de las poblaciones linfocitarias en el inóculo.	66
1.7. El compartimento CD56 ^{bright} dentro de las células <i>natural killer</i>	69
1.8. Células NK CD56 ^{bright} : expansión y reducción en patología humana	78
2. Hipótesis y objetivos	85
3. Capítulo I: “Expansiones persistentes de linfocitos T citotóxicos tras trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos: comportamiento longitudinal, impacto clínico y ausencia de mutaciones en <i>STAT3</i> ”	90
3.1. Introducción	92
3.2. Pacientes, materiales y métodos.	93
3.3. Resultados.....	95
3.4. Discusión	112
3.5. Conclusiones.....	116
4. Capítulo II: “Valor pronóstico del compartimento <i>natural killer</i> CD56 ^{bright} en el inóculo infundido en el desarrollo de enfermedad injerto contra receptor crónica tras trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos”	118
4.1. Introducción.....	120

4.2. Pacientes, material y métodos.....	121
4.3. Resultados.....	124
4.4. Discusión.....	140
4.5. Conclusiones.....	144
5. Conclusiones generales.....	146
6. Referencias.....	150
7. Apéndice: Producción científica en relación al trabajo de Tesis.....	173
7.1. Artículos Científicos.....	175
7.2. Comunicaciones a Congresos.....	175

ABREVIATURAS

Abreviaturas

#

±DE: ± Desviación Estándar

A

AHAI: Anemia hemolítica autoinmune

Alo-TPH: Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

ARA-C: arabinósido de citosina

ATG: timoglobulina

AUC: Área bajo la curva

B

BEAM: carmustina, etopósido, citarabina y melfalán

BU: Busulfán

C

CD: Cluster de diferenciación

CE: Eficiencia de colección

CMF: citometría de flujo

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

CMN: Células mononucleadas.

CMV: Citomegalovirus

CNT: células nucleadas totales

CPA: célula presentadora de antígeno

CVC: Catéter Venoso Central

CY: Ciclofosfamida

CyA: Ciclosporina A

D

DE: Donante emparentado

DNE: Donante no emparentado

E

EICR: Enfermedad injerto contra receptor.

EICRa: Enfermedad injerto contra receptor aguda

EICRc: Enfermedad injerto contra receptor crónica

eLTC: expansión de linfocitos T citotóxicos

F

F: femenino

FLU: Fludarabina

H

HLA: Antígeno leucocitario humano

HTLV-1: Virus linfotrópico humano de células T tipo 1

I

IC: Intervalo de confianza

ICT: Injerto contra tumor

IDA: Idarrubicina,

IgE: Inmunoglobulina E

IL-10: Interleuquina 10

IL-12: Interleuquina 12

IL-13: Interleuquina 13

IL-15: Interleuquina 15

IL-18: Interleuquina 18

IL18R: Receptor de interleuquina 18

IL1RI: Receptor 1 de interleuquina 1

IL-2: Interleuquina 2

IL-21: Interleuquina 21

IL-6: Interleuquina 6

IL-7: Interleuquina 7

ILD: infusión de linfocitos del donante

ILT2: Immunoglobulin-like transcript 2

IMF: Intensidad media de fluorescencia

INF- α : Interferón alfa

INF- β : Interferón beta β

INF- γ : Interferón gamma.

IR: Intensidad reducida

K

KIR: killer cell immunoglobulin-like receptors

L

LAM: Leucemia aguda mieloblástica

LES: Lupus eritematoso sistémico

LGG: Linfocitos grandes granulares

LLC: Leucemia linfática crónica

LLGG: Leucemia de linfocitos grandes granulares

LTC: Linfocitos T citotóxicos

M

M: Masculino

MA: Mieloablativos

MEL: melfalán.

MO: Médula ósea

MTX: Metotrexato

N

NK: Natural Killer

NKreg: Natural killer reguladoras

NMA: No Mieloablativos

P

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PH: Progenitores hematopoyéticos.

PHSP: Progenitores hematopoyéticos de sangre periférica.

PIAS: Proteínas inhibidoras de *STAT*

Q

QT: quimioterapia

R

RC: Remisión completa

RIQ: Rango intercuartílico

ROC: Receiver Operator curve

RP: Respuesta parcial

RR: Riesgo relativo

S

SCU: Sangre de cordón umbilical

SG: Supervivencia global

SH2: Dominios homólogos a src 2

SLE: Supervivencia libre de enfermedad

SLP: Supervivencia libre de progresión

SMD: Síndrome mielodisplásico

SOCS: fosfatasa supresora de señalización de citoquinas

SP: Sangre periférica

STAT3: gen traductor de señal y activador de la transcripción 3

T

TAD: Dominio de activación de la transcripción

TAP: Transportador asociado al procesamiento de antígenos.

TBI*: irradiación corporal total a bajas dosis (2 a 4 Gy)

TBI: Irradiación corporal total

TBI^ irradiación corporal total a altas dosis (8 a 12.3 Gy)

TCR: receptor de células T

TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos

TREC: círculos de escisión del reordenamiento del Receptor de células T

Tregs: Células T reguladoras

TST: Test cutáneo tuberculina

V

VEB: Virus de Epstein-Barr

VHC: Virus de hepatitis C

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Lista de figuras

Figura 1. Regímenes de acondicionamiento más utilizados clasificados según la intensidad.	42
Figura 2. Tiempos de la reconstitución inmune tras Alo-TPH.	46
Figura 3. Dominios de <i>STAT3</i> y <i>STAT5b</i> y localización de las principales mutaciones adquiridas.	58
Figura 4. Subpoblaciones de células NK humanas basadas en la expresión relativa de CD16 y CD56.	70
Figura 5.1. Curvas Kaplan-Meier mostrando las diferencias en supervivencia global (A) y tiempo hasta la recaída (B), entre los pacientes en función de que presentaran una eLTC relativa.	100
Figura 5.2. Curvas Kaplan-Meier mostrando las diferencias en supervivencia global (A) y tiempo hasta la recaída (B), entre los pacientes en función de que presentaran una eLTC absoluta.	103
Figura 5.3. Dinámica de las expansiones relativas.	104
Figura 5.4. Dinámica de las expansiones absolutas.	106
Figura 5.5. Dinámica del recuento de linfocitos CD8+ y CD4+.	108
Figura 6. Estrategia de selección <i>-gating-</i> , en la determinación de porcentaje e intensidad de fluorescencia media de los compartimentos <i>bright</i> y <i>dim</i> dentro de los linfocitos NK.	123
Figura 7. Porcentaje de células CD56 ^{bright} NK en el inóculo de los pacientes incluidos en la cohorte 1 (n=104)	128

Figura 8. Porcentaje de células CD56 ^{bright} NK en el inóculo de los pacientes incluidos en la cohorte 2 (n=207)	128
--	-----

Figura 9. Kaplan Meier, para la cohorte 1, en función de presentar \leq ó $>$ de 0,52% CD56 ^{bright} NK en total de linfocitos en el inóculo, para los eventos: A) cualquier Grado de EICR crónica; B) EICR crónica severa.	133
--	-----

Figura 10. Kaplan Meier, para la cohorte 2, en función de presentar \leq ó $>$ de 0.52% CD56 ^{bright} NK en total de linfocitos en el inóculo, para los eventos: a) cualquier grado de EICR crónica; b) EICR crónica severa.	139
---	-----

Lista de tablas

Tabla 1. Reconstitución inmune tras alo-TPH.	45
--	----

Tabla 2. Resumen de los artículos sobre linfocitosis de LGG tras trasplante.	51
--	----

Tabla 3. Las principales características de los dos sistemas de aféresis utilizados en este estudio: COBE Spectra® hasta 2015, Spectra Optia® de 2015 en adelante.	63
--	----

Tabla 4. Estudios recientes comparando las características técnicas de los dispositivos de aféresis para la recolección de PHSP.	64
--	----

Tabla 5.1. Comparación fenotípica entre las células NK CD56 ^{bright} y CD56 ^{dim} .	73
---	----

Tabla 5.2. Comparación fenotípica entre las células NK CD56 ^{bright} y CD56 ^{dim} .	74
---	----

Tabla 6.1. Principales características de los pacientes incluidos en el estudio antes de infusión de PH.	96
--	----

Tabla 6.2 Principales características de los pacientes incluidos en el estudio: infusión seguimiento.	97
Tabla 7. Eventos infecciosos clínicamente relevantes según el periodo post-alo-TPH en función de la presencia o ausencia de eLTC relativas o absolutas	99
Tabla 8.1. Características demográficas, de la enfermedad de base y del procedimiento de TPH de los 14 pacientes que desarrollaron una eLTC absoluta.	101
Tabla 8.2. Eventos clínicos de los 14 pacientes que desarrollaron una eLTC absoluta.	102
Tabla 9. Características inmunofenotípicas ampliadas de 5 casos con eLTC absoluta y 12 casos de eLTC relativa.	111
Tabla 10. Principales características al trasplante de los pacientes incluidos en el estudio.	125
Tabla 11. Distribución celular en el inóculo. Los porcentajes de los distintos compartimentos inmunes se calculan respecto del total de linfocitos.	126
Tabla 12. Distribución de los pacientes en función del grado y tiempo de desarrollo de EICR aguda y crónica.	127
Tabla 13. Análisis univariante en la cohorte seleccionada de 104 pacientes (progenitores de SP/donante emparentado idéntico) de parámetros relacionados con el desarrollo de EICR crónica severa	129
Tabla 14. Análisis multivariante, incluyendo aquellas variables que en el univariante presentaron $p < 0,150$, en la cohorte (104 pacientes) respecto de desarrollar EICR crónica severa.	130

Tabla 15. Análisis univariante en la cohorte 1 de parámetros relacionados con el desarrollo de cualquier grado de EICR crónica	131
Tabla 16. Análisis multivariante, incluyendo aquellas variables que en el univariante presentaran $p < 0,150$, en la cohorte 1 en relación con el desarrollo de cualquier grado de EICR crónica.	132
Tabla 17. Análisis univariante en la cohorte 2 respecto de desarrollar EICR crónica severa	135
Tabla 18. Análisis multivariante, incluyendo aquellas variables que en el univariante presentaran $p < 0,150$, en la cohorte 2 respecto de desarrollar EICR crónica severa.	136
Tabla 19. Análisis univariante en la cohorte total de 2 respecto de desarrollar cualquier grado de EICR crónica.	137
Tabla 20. Análisis multivariante, incluyendo aquellas variables que en el univariante presentaran $p < 0,150$, en la cohorte 2 respecto de desarrollar EICR crónica de cualquier grado.	138

RESUMEN

Resumen

En la fase inicial de la reconstitución inmunológica en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) se han detectado expansiones persistentes de linfocitos T citotóxicos (eLTC) que en la mayoría de los casos se consideraron una respuesta fisiológica si bien, la descripción de casos de leucemias de linfocitos grandes granulares (LLGG) genera incertidumbre. Por otro lado, el uso de inóculo de sangre periférica (SP) ha sustituido al de médula ósea en el alo-TPH de pacientes con patología neoplásica, si bien se asocia con un aumento de enfermedad injerto contra receptor (EICR). Según *Kariminia et al.*, una mayor proporción de células *Natural Killer* (NK) CD56^{bright} se relaciona con una menor tasa de EICR crónica.

El análisis de las principales poblaciones inmunes SP durante el periodo post trasplante y en el inóculo nos permitía estudiar el impacto clínico de las eLTC y validar la reciente comunicación del valor predictor del compartimento de células NK CD56^{bright} del inóculo.

Con el objetivo de discernir el impacto clínico de las eLTC, incluimos 154 pacientes caracterizados por una edad media de 42 años, predominio masculino y proporción similar entre aquellos que habían recibido acondicionamiento de intensidad reducida o mieloablativo. Para el análisis clínico establecimos dos definiciones de eLTC: eLTC relativa, definida por ratio entre los linfocitos T CD8+/CD4+ superior a 1,5; y eLTC absoluta caracterizada por un número de linfocitos T CD8+ mayor a $2 \times 10^9/L$. En ambos la condición debía persistir al menos 6 meses.

Las eLTC relativas fueron detectadas en 75 de los 154 pacientes, caracterizados por una mayor edad, haber recibido acondicionamiento de intensidad reducida, así como profilaxis de EICR con timoglobulina, recibir un inóculo de donante no emparentado y presentar en el post trasplante, reactivación de citomegalovirus y desarrollo de EICR aguda grave.

De los 154 pacientes, 14 desarrollaron eLTC absolutas. Éstas se asociaron de forma significativa con el desarrollo de EICR crónica moderada y severa. Ninguno de los pacientes con eLTC absolutas recayó, mientras que 31 pacientes (22%) sin este tipo de expansiones sí lo hizo. Tienen una tendencia hacia su incremento entre los días +30 y

+100 manteniéndose esta dinámica hasta el año en la mayoría de los casos (92%), momento tras el cual empiezan a descender.

El nulo impacto de las eLTC, ya fueran relativas o absolutas, en el potencial desarrollo de una LLGG y la ausencia de mutaciones somáticas en el exón 21 del gen *STAT3*, apoya su naturaleza fisiológica.

En cuanto al estudio del impacto de las células NK CD56^{bright}, se seleccionaron pacientes sometidos a alo-TPH en nuestro centro y definidos por presentar la determinación cuantitativa de las subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo en el inóculo, que el esquema de movilización del donante incluyera G-CSF y el inóculo no fuera manipulado.

Se diferenciaron dos cohortes para su análisis independiente. Una descartaba a aquellos pacientes con alo-TPH de donante no emparentado, haploidéntico y/o que hubieran fallecido antes del día +100 (reflejando los criterios *Kariminia et al.*), finalmente compuesta por 104 pacientes. Dos variables, el porcentaje de células NK CD56^{bright} y la disparidad de género mostraron una independencia pronóstica del desarrollo de EICR severa con un RR de 3,2 y 2,5 respectivamente. En la cohorte global de 207 pacientes, tres variables se relacionaron con el RR de sufrir una EICR severa: porcentaje de células NK CD56^{bright}, disparidad de género e identidad HLA.

Para concluir, nuestra experiencia nos ha permitido confirmar, la naturaleza benigna de las eLTC en nuestra cohorte de pacientes sometidos a alo-TPH y su relación con el desarrollo de EICR. Igualmente reafirmamos la relación significativa de una menor proporción de células NK CD56^{bright} en el inóculo movilizado con G-CSF de SP y el desarrollo de EICR severa en el contexto del alo-TPH de donante emparentado y, además, su independencia pronóstica respecto de otros factores, subpoblaciones inmunes y variables clínicas, que han sido recurrentemente asociados con la EICR crónica.

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) es un procedimiento terapéutico que permite la reconstitución de la hematopoyesis mediante la infusión de células pluripotenciales procedentes de un donante sano. Actualmente es considerado el tratamiento de elección en una serie de enfermedades hematológicas (neoplásicas y no neoplásicas) y no hematológicas, tanto congénitas como adquiridas.^{1,2}

Podemos clasificar el alo-TPH según el tipo de donante, el origen de los progenitores hematopoyéticos (PH), el tipo de acondicionamiento y si se ha producido manipulación del inóculo: ¹⁻³

- Tipo de donante:
 - Donante Emparentado (DE): hermano u otro familiar HLA compatible, hermano gemelo univitelino (singénico), hermano u otro familiar 50% idéntico (haploidéntico).
 - Donante no Emparentado (DNE): donante voluntario no familiar HLA compatible.
- Fuente de PH: médula ósea (MO), sangre periférica (SP) y sangre de cordón umbilical (SCU).
- Tipo de acondicionamiento: mieloablativo, no mieloablativo y de intensidad reducida.
- Manipulación de los PH: depleción linfóide T (*ex-vivo* o *in-vivo*) y expansión celular (en el trasplante de SCU).

Los objetivos del alo-TPH son: ¹

- Sustituir la hematopoyesis del paciente por ser total o parcialmente defectuosa, insuficiente o neoplásica, por una normal procedente de un donante sano consiguiendo así la curación de la enfermedad.
- Promover el efecto inmunomodulador injerto contra tumor (ICT), considerado un efecto antitumoral beneficioso mediado por las células T del injerto que permite mantener en remisión la enfermedad de base.

- Tratamiento de las alteraciones no malignas de la médula ósea, ya sean congénitas o adquiridas.

Para conseguir estos objetivos se requiere un tratamiento de preparación (acondicionamiento) que incluye quimioterapia, asociada o no a radioterapia corporal total e inmunosupresores y la posterior reconstitución de la hematopoyesis mediante la administración de PH de un donante sano.

1.1.1. Fases del alo-TPH

En todo alo-TPH pueden distinguirse diversas fases evolutivas: ^{1,2}

Estudios pre-trasplante:

Es la evaluación previa del donante y del paciente (receptor). En el caso del paciente se debe realizar una historia clínica completa incluyendo exploración física para valorar su situación basal y el estado de su enfermedad de base, además de realizar las pruebas funcionales necesarias para evaluar la función de los principales órganos (analítica con serologías, espirometría, ecocardiograma...).

Colocación de un catéter venoso central (CVC):

Para la práctica de un alo-TPH es preciso disponer de un CVC que permita la administración de citostáticos, PH, inmunosupresores, líquidos, electrolitos, antimicrobianos, nutrición parental y soporte hemoterápico, así como la obtención de muestras de sangre.

Acondicionamiento:

El acondicionamiento incluye quimioterapia asociada o no a radioterapia corporal total e inmunosupresores. Con esto se pretende reducir o eliminar las células malignas del receptor, liberar el nicho medular del receptor para permitir el injerto de las células madre hematopoyéticas del donante y suprimir la inmunidad del huésped para prevenir el rechazo de las células del donante. ⁴

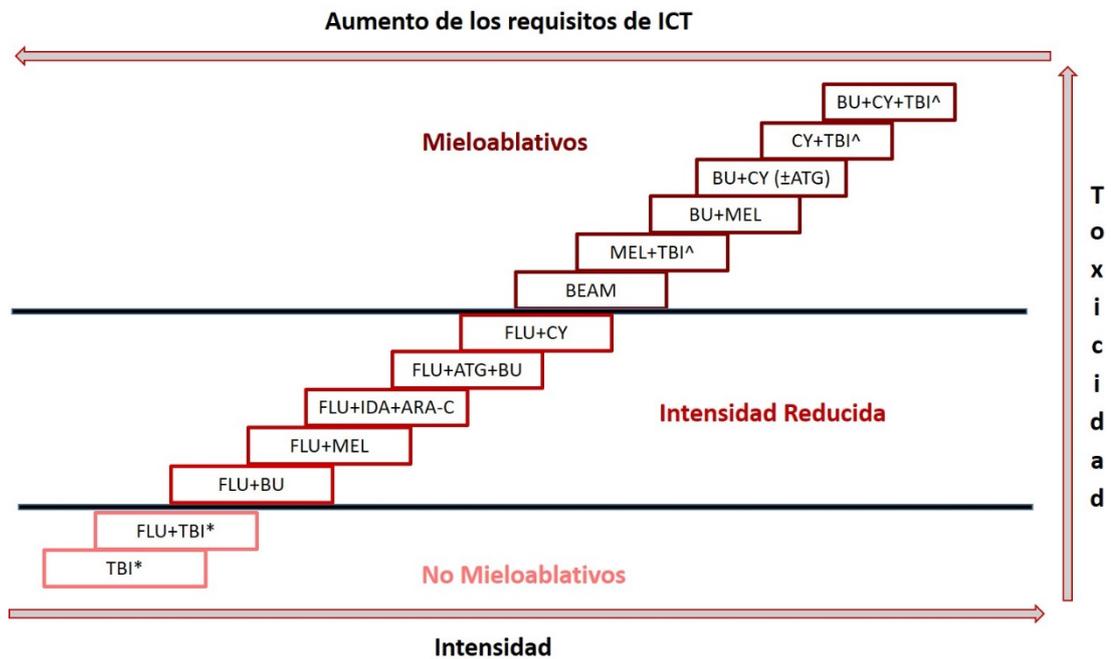
Se han diseñado múltiples regímenes de acondicionamiento para el trasplante. Según la intensidad de la inmunosupresión inducida distinguimos ^{4,5} (**Figura 1**): mieloablativos (MA), no mieloablativos (NMA) y de intensidad reducida (IR). La elección del acondicionamiento depende del tipo de enfermedad de base, la histocompatibilidad donante-receptor, la composición del producto hematopoyético y las comorbilidades del receptor.

Los acondicionamientos MA o también llamados convencionales se basan en dosis elevadas de quimioterapia y/o de radiación corporal total.⁴ Estos regímenes resultan en una eliminación absoluta de la hematopoyesis del receptor y la toxicidad que inducen es elevada produciendo citopenias intensas que no se espera que puedan recuperar sin soporte de PH. Debido a esta toxicidad solo pueden ser usados en pacientes relativamente jóvenes y sin comorbilidades. Los acondicionamientos MA suelen estar basados en el uso de agentes alquilantes y/o irradiación corporal total a dosis elevadas.^{5,6}

En los acondicionamientos NMA no se erradica la hematopoyesis del receptor sino que produce una mielosupresión leve y su acción anti-tumoral se basa, casi de manera exclusiva, en el efecto del ICT.⁴ Las citopenias que producen son moderadas y se espera que se puedan recuperar incluso sin necesidad del injerto de lo PH infundidos. El acondicionamiento NMA más frecuente consiste en el uso de irradiación corporal total a dosis bajas (TBI*), 2 Gy, en combinación con fludarabina.^{5,6}

Los regímenes de IR se encuentran entre los dos anteriores. Este tipo de acondicionamiento se desarrolló con el objetivo de disminuir la morbilidad y mortalidad relacionada con el trasplante y así poder realizarlo en pacientes de mayor edad. Se basan en moderar la quimioterapia mielosupresora pero proporcionar suficiente inmunosupresión para prevenir el rechazo del injerto.⁴ Su capacidad para eliminar las células tumorales del receptor se basa fundamentalmente en el efecto ICT aloimmune. Tanto la toxicidad hematológica como sistémica pueden ocurrir con este tipo de regímenes, pero son menos frecuentes y menos graves que tras el acondicionamiento MA. No todos los regímenes de IR son equivalentes, existiendo diversos esquemas en función de si se favorecen su función inmuno o mielosupresora. Normalmente combinan fludarabina con dosis intermedias de alquilantes (como el busulfán, melfalán y tiotepa) con o sin anticuerpos dirigidos contra las células T.^{5,6}

Figura 1. Regímenes de acondicionamiento más utilizados clasificados según la intensidad.



Adaptado de Deeg y Sandmaier.⁵

Abreviaturas: ARA-C: arabinósido de citosina; ATG: timoglobulina; BEAM: carmustina, etopósido, citarabina y melfalán; BU: Busulfán; CY: Ciclofosfámid; FLU: Fludarabina; ICT: Injerto contra tumor; IDA: idarrubicina, TBI^ irradiación corporal total a altas dosis (8 a 12.3 Gy); TBI*: irradiación corporal total a bajas dosis (2 a 4 Gy); MEL: melfalán.

Administración de PH

Tras 24 o 48 horas de descanso después del acondicionamiento se procede a la infusión de PH. Se utilizan tres fuentes principales de progenitores hematopoyéticos: MO, SP (previa movilización con factores de crecimiento) y SCU. El inóculo (PH infundidos al receptor) además de estar enriquecido en células progenitoras, también contiene células del sistema inmune que son las responsables del anteriormente mencionado efecto ICT cuando se dirigen contra las células tumorales, pero también pueden dañar tejido sano del receptor dando lugar a la indeseada enfermedad injerto contra receptor (EICR).

La elevada tasa de morbilidad relacionada con la EICR obliga a realizar un tratamiento profiláctico ajustado al riesgo de EICR de cada paciente y en función de las

características del donante y receptor. Éste se inicia previo a la infusión de PH y se mantiene (salvo desarrollo de EICR) durante 6-9 meses.

Fase de aplasia post-TPH

Ésta es secundaria a la administración de altas dosis altas de quimio y radioterapia en el acondicionamiento. Tiene una duración media de entre 2 y 4 semanas y se resuelve cuando se produce el injerto. Se considera injerto leucocitario cuando alcanza $> 0.5 \times 10^9/L$ neutrófilos durante 3 días consecutivos e injerto plaquetar cuando alcanza $> 20 \times 10^9/L$ plaquetas sin transfusión en los 3 días previos.

Recuperación hematológica (Quimerismo)

La dinámica del implante tras el trasplante puede verse influenciada por múltiples factores siendo los más importantes: edad del paciente y del donante, enfermedad de base, tratamientos previos recibidos, tipo de PH empleado, cantidad de PH administrados, manipulación del inóculo, tipo de acondicionamiento recibido y profilaxis de la EICR.

El quimerismo se define como la coexistencia en un mismo organismo de poblaciones celulares originarias de dos individuos genéticamente distintos. Para obtener quimerismo es preciso inducir en el receptor una situación de inmunosupresión que permita la supervivencia de las células del donante y del receptor. Según la existencia de células hematopoyéticas del receptor tras el TPH distinguimos quimerismo completo (todas las células hematopoyéticas proceden del donante) y quimerismo mixto (coexistencia de células hematopoyéticas del donante y del receptor).

Evolución a largo plazo

Se llevan a cabo seguimientos periódicos donde se evalúan las complicaciones a corto-largo plazo (como la EICR, segundos tumores, complicaciones cardiovasculares o de otros órganos...), la reconstitución inmune post-TPH y la situación de la enfermedad de base.

1.2. Reconstitución inmune tras alo-TPH

La reconstitución de las distintas poblaciones inmunes después del alo-TPH es un proceso dinámico que ocurre en distintos periodos de tiempo (**Tabla 1** y **Figura 2**). Comienza con la recuperación de la inmunidad innata en las primeras semanas, seguido del sistema inmune adaptativo cuya recuperación puede tardar hasta dos o más años.⁷ Tras el tratamiento de acondicionamiento, los receptores atraviesan una fase de aplasia hasta la recuperación de los neutrófilos cuya duración varía según el tipo de alo-TPH siendo, de media, de unos 14 días tras el alo-TPH de SP, 21 días tras el de MO y 30 días tras el alo-TPH de SCU.⁸⁻¹⁰ Esto se debe a que la cantidad total de células nucleadas (CNT) y de células CD34+ que contiene el inóculo son factores clave en la velocidad del injerto. Además, estudios recientes han demostrado que, en los pacientes que recibían un alo-TPH de SP con acondicionamiento de IR, una cantidad elevada de CNT se asociaban con una mejora en la supervivencia global (SG), una menor tasa de recaídas y una incidencia aumentada de enfermedad injerto contra receptor (EICR).¹¹ Estos resultados son controvertidos ya que una mayor incidencia de EICR se ha relacionado con una menor SG y los estudios con CMN son escasos. Por otro lado, se ha comunicado en el contexto del alo-TPH con acondicionamiento MA y de IR, que los pacientes que reciben una mayor cantidad de CD34+ en el inóculo procedente de la movilización de sangre periférica tenían un injerto plaquetario más rápido, pero una menor SG (probablemente relacionada con el incremento en la mortalidad relacionada con la EICR) y un incremento en la tasa de recaídas. En los pacientes que recibieron progenitores de MO un mayor número de CNT y CD34+ se relacionó con un injerto de neutrófilos más rápido.¹²

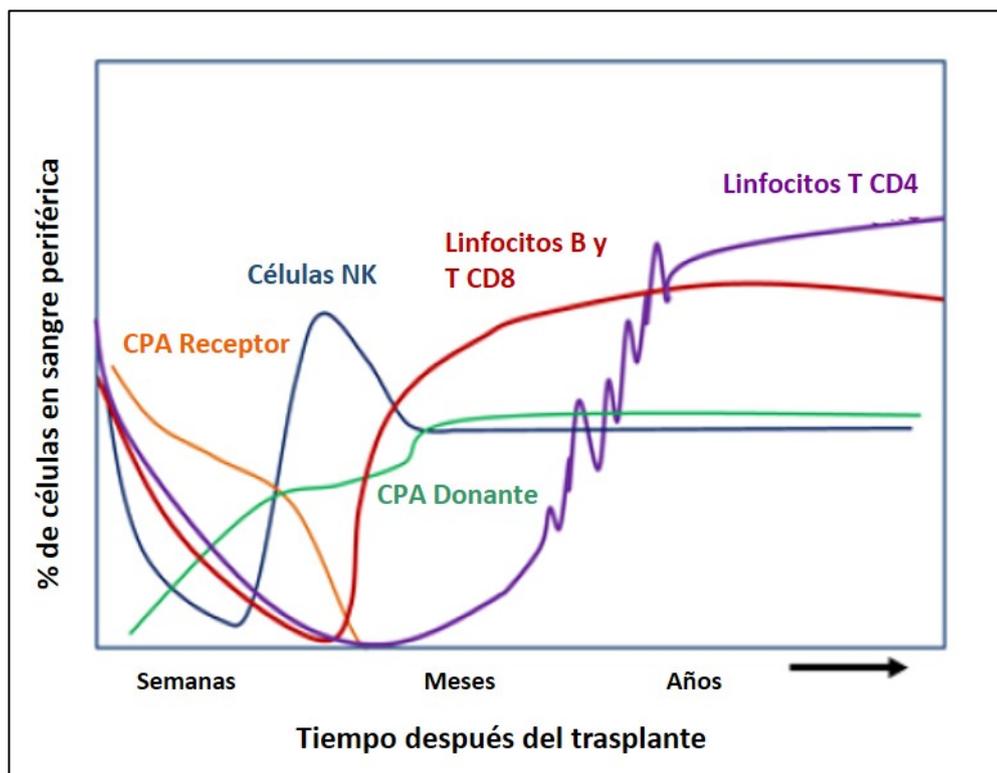
Tabla 1. Reconstitución inmune tras alo-TPH.

Células Inmunes	Recuperación tras alo-TPH
Neutrófilos $> 0.5 \times 10^9/L$	≈ 14 días para PHSP ≈ 21 días para MO ≈ 30 días para SCU
Células NK	30-100 días
Células T	100 días
Células B CD19+	1-2 años

Adaptado de *Ogonek et al.*,⁸

Abreviaturas: alo-TPH: trasplante alogénico, NK: *natural killer*, MO: médula ósea, PHSP: progenitores hematopoyéticos de sangre periférica, SCU: sangre de cordón umbilical.

Figura 2. Tiempos de la reconstitución inmune tras Alo-TPH.



Adaptado de Mehta et al.,⁷

Abreviaturas: CPA: célula presentadora de antígeno, NK: *natural killer*.

Al producirse la reconstitución del sistema inmunológico en diferentes tiempos, el receptor será más susceptible a determinados patógenos según en el periodo post-trasplante.

La fase previa al injerto se caracteriza por una inmunosupresión general con alta susceptibilidad a infecciones bacterianas y fúngicas que son normalmente bien controladas con la medicación administrada bien como profilaxis o como tratamiento.¹³

Los primeros 100 días tras el alo-TPH (fase de injerto) destaca la inmunodeficiencia celular debida a un número reducido de linfocitos *natural killer* (NK) dentro del sistema inmune innato y de linfocitos T por parte del sistema inmune adaptativo. Esta situación hace que los pacientes tengan un mayor riesgo de padecer infecciones fúngicas y reactivaciones víricas, sobre todo de Citomegalovirus (CMV) y virus de Epstein-Barr (VEB).⁸

A partir del día +100 (Fase post-injerto) se caracteriza por una alta prevalencia de infecciones o reactivaciones por el virus de la varicela zoster (VVZ) y la reconstitución progresiva de linfocitos B y T, que pueden alcanzar niveles normales a partir de los 6-9 meses post-TPH, aunque puede prolongarse hasta 1-2 años.

Durante el primer año tras el trasplante el compartimento de células T no alcanza cifras normales y está compuesto de un número mayor de células CD8+ y células T inmaduras comparado con el de individuos sanos. La recuperación del compartimento de células T se produce mediante dos mecanismos:¹⁴

- Vía independiente del timo: a través de la expansión en sangre periférica de células T de memoria del donante infundidas con el inóculo y de células T de memoria del propio receptor que sobreviven al acondicionamiento, promovida tanto por diversas citoquinas como por diversos antígenos alogénicos presentes en el receptor.
- Vía dependiente del timo: a través de la producción de células T inmaduras en el timo del receptor a partir de precursores hematopoyéticos del donante.

La expansión periférica de células T maduras del donante a través de la vía independiente del timo tiene lugar de manera temprana tras el trasplante. Es la consecuencia de mecanismos homeostáticos que son capaces de controlar las proporciones de este compartimento de células T maduras. En el individuo normal, el compartimento de células T de memoria depende de citoquinas como la interleuquina 7 (IL-7) o la interleuquina 15 (IL-15) que determinan su maduración, proliferación y supervivencia. Esto se realiza de una manera competitiva, por lo que cuando una célula T entra en contacto con un antígeno su activación incrementa su competitividad, aumentando su avidez por las citoquinas homeostáticas y reemplazando de esa manera a las células T menos competitivas. Tras el alo-TPH, en la fase temprana, la IL-7 y la IL-15 son producidas con normalidad pero apenas se consumen debido al estado linfopénico del receptor, Esto da lugar a niveles altos de estas dos citoquinas.¹⁵ En este contexto, las pocas células T presentes tras el trasplante desarrollan una expansión intensa hasta llegar a los rangos normales de células T de memoria en individuos normales. Esta vía de reconstitución inmune explica diversas observaciones como, por ejemplo, el elevado porcentaje de células que entran en ciclo celular y el rápido acortamiento de los telómeros

de las células T en los primeros meses tras el trasplante.¹⁶ Aunque afecta principalmente a las células de memoria T, las células naïve o inmaduras también pueden verse afectadas por esta expansión independiente del timo.¹⁷

Los linfocitos T CD4⁺ alcanzan valores normales de manera más tardía que los linfocitos T CD8⁺. Mientras que estos últimos se recuperan dentro de los primeros 6 meses, los linfocitos CD4⁺ lo hacen más allá del año del procedimiento debido a que son más dependientes de la generación de CD4⁺ inmaduros en el timo. Esto explica la inversión en la ratio CD4⁺/CD8⁺ observada tras alo-TPH.¹⁸

En comparación con las poblaciones T del inóculo, la expansión homeostática periférica induce cambios significativos en la distribución de las poblaciones linfocitarias durante el periodo temprano post-TPH. De hecho, aunque esta expansión periférica homeostática no es estrictamente un fenómeno inducido por antígenos, las células que reconocen antígenos presentes en el huésped en el momento del trasplante pueden adquirir una ventaja proliferativa frente a otros clones de células T. Es por ello que se produce un crecimiento de un número limitado de clones de linfocitos T mientras otras células específicas se pierden, lo que conduce a un repertorio global mucho más restringido que el del donante.

Varias semanas/meses tras el alo-TPH, una segunda “ola” de células T aparece originada *de novo* a partir de la timopoyesis. En pacientes jóvenes sometidos a alo-TPH mieloablatoivo esta generación *de novo* de células T inmaduras a través del timo comienza a desarrollar un papel en la inmunidad del huésped a partir del día +100, aunque la restauración completa de este *pool* de células T inmaduras puede llevar de uno a dos años.

Una técnica muy útil para evaluar el funcionamiento del timo es la cuantificación de los fragmentos de excisión de ADN circular asociados al receptor de las células T (TRECs). Los TRECs consisten en fragmentos de ADN que contienen el *locus* δ que se elimina durante la recombinación del TCR en los linfocitos T $\alpha\beta$ en el timo. Ya que se trata de ADN episomal, los TRECs no se replican durante la división celular así que su número refleja de manera exacta la producción de linfocitos T por el timo y recientemente se han propuesto como marcadores indirectos de los linfocitos T inmaduros CD4⁺ y CD45RA⁺ derivados del timo.¹⁹ Los niveles de TRECs se mantienen bajos hasta aproximadamente 3-6 meses tras el alo-TPH.¹⁴

La producción dependiente del timo depende en última instancia de que se generen suficientes precursores linfoides que injerten y se desarrollen en un microambiente tímico óptimo. Este microambiente puede verse comprometido en aquellos pacientes en los que el timo esté involucionado (por ejemplo, paciente de edad avanzada)²⁰ o esté dañado por la enfermedad injerto contra receptor.²¹

Por otro lado, un subgrupo especial de células CD4⁺ son las llamadas células T reguladoras (Tregs), que podrían tener un papel importante en el pronóstico tras alo-TPH.¹⁹ Los Tregs suprimen la actividad de las células efectoras T disminuyendo su actividad proinflamatoria y promoviendo la homeostasis inmune.²² Diversos modelos experimentales, tanto clínicos como preclínicos, han mostrado que la reconstitución de los linfocitos Tregs desempeña un papel crucial en la atenuación de la EICR mientras se preserva el efecto de ICT.^{23,24}

Existen, además, varias moléculas que son necesarias para la supervivencia de las poblaciones T en sangre periférica, incluyendo citoquinas (como la IL-7) y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Los linfocitos T inmaduros CD4⁺ y CD8⁺ derivados del timo dependen para su supervivencia y expansión de la IL-7.²⁵ Por otro lado, las células T de memoria CD8⁺CD27⁺ basan su expansión y supervivencia en la señalización tanto de la IL-7 como de la IL-15.²⁶ Las células T inmaduras parecen depender de manera más sensible que las de memoria de ser reconocidas por complejos péptido-CMH.²⁷ Sin embargo, aunque las células T de memoria no comparten esta dependencia, se observó que la falta de ligandos CMH puede afectar su función.²⁸ Basándose en estas observaciones, las células dendríticas emergen como candidatos clave en la regulación de esta expansión periférica homeostática de las células CD4⁺, tanto por presentar moléculas clase II del CMH como por ser productoras de IL-7. En relación a esto, *Guimond y col.* demostraron que la producción de IL-7 por las células dendríticas derivadas de la médula ósea desencadenaban una expansión homeostática de linfocitos T CD4⁺ en el contexto de linfopenias profundas.²⁹

En pacientes de edad avanzada la disminución en el número de células T CD4⁺ inmaduras se ha relacionado con un mayor riesgo de sufrir infecciones oportunistas y con un incremento del riesgo de recaída de la enfermedad de base.^{30,31} Además, varios estudios han comunicado como el desarrollo de EICR agrava esa disminución de células T CD4⁺ inmaduras.^{32,33}

La reconstitución inmune de los linfocitos B presenta marcadas diferencias con la de las células T. Las células B se mantienen en recuentos bajos durante los primeros meses, no alcanzando cifras normales hasta más allá del primer año tras el alo-TPH. La normalización cuantitativa del compartimento B se ve retrasado en caso de EICR y/o de su tratamiento.³⁴ Durante los dos primeros años tras el trasplante, la mayoría de los linfocitos B del donante se mantienen inmaduros, produciendo de manera predominante IgM antes que IgG o IgA y sin la presencia de mutaciones somáticas de los genes de la región VDJ.³⁵ Posteriormente, se recuperan progresivamente los títulos de IgG e IgA entre el primer y segundo año post alo-TPH. De manera general, la reconstitución de linfocitos B tras alo-TPH reproduce de manera fiel las fases de la ontogenia B que ocurre en los niños, pero a una velocidad mucho menor, debido a la falta de linfocitos T CD4+ que los linfocitos B requieren para lograr el cambio de isotipo. Ya que las células plasmáticas presentan una elevada resistencia al efecto de la radioterapia y quimioterapia y, además, son las células más longevas del sistema inmune, se pueden detectar inmunoglobulinas originadas por células del receptor incluso años después del alo-TPH.

Las células NK suelen normalizarse tras dos meses desde el alo-TPH. El fenotipo de estas células NK que se desarrollan en el receptor es diferente del que encontramos en individuos normales, con una mayor representación de la fracción CD56^{bright}CD16^{neg}.³⁶ Estas células CD56^{bright}CD16^{neg} producen mayor cantidad de interferón gamma (INF γ) y son menos citotóxicas que la fracción mayoritaria de células NK CD56^{dim}CD16⁺. Recientemente se ha demostrado que la IL-15 también juega un papel importante en la maduración de las células NK tras alo-TPH.³⁷

1.3. Expansiones persistentes de linfocitos T citotóxicos tras alo-TPH

Las expansiones persistentes de linfocitos grandes granulares (LGG) en receptores de trasplante alogénico han sido descritas como de naturaleza policlonal, reactiva y autolimitada, pasando por linfocitosis oligo o monoclonales indolentes desde el punto de vista clínico, hasta verdaderas leucemias LGG.^{38,39,40,41}

1.3.1 Incidencia

La mayoría de los estudios comunican una incidencia de expansiones de linfocitos LGG tras trasplante de progenitores hematopoyéticos entre un 0.5 y un 18.4% de los pacientes, como muestra la **Tabla 2**. En el contexto de trasplante de órgano sólido, la incidencia de expansiones LGG descritas suele ser mayor, llegando a comunicarse en 18 de 33 pacientes en el trabajo de *Sabnani et al.*,³⁹ En los diferentes estudios el intervalo de tiempo entre el trasplante y la aparición de la linfocitosis es muy heterogéneo, oscilando entre 1 y 61 meses. De la misma manera, los recuentos de LGG expandidos de manera anómala se han descrito desde 0.6 hasta 11.5 x 10⁹/Litro (**tabla 2**).

Tabla 2. Resumen de los artículos sobre linfocitosis de LGG tras trasplante.

Nº Pacientes	Género (M:F)	Mediana de edad (años)	Tipo de Trasplante	Ratio de LGG (pacientes)	Tipo de linfocitosis LGG	Mediana desde el trasplante hasta la linfocitosis de LGG	Mediana del número de LGG (10 ⁹ /L)
201	3:3	54 (28-60)	TPH	3% (6)	T-LGG Linfocitosis	295 días (75-450)	2.3 (rango 2.0-4.1)
418	39:38	47 (19-68)	TPH	18.4 % (77)	LGG linfocitosis	312 días (26-1840)	1.6 (rango 0.6-2.7)
215	7:7	38.5 (25-64)	TPH	7% (14)	T-LGG linfocitosis	16 meses (3-58 meses)	2.1 (rango 1.3-11.5)
1675	4:3	50 (29-81)	TPH	0.5% (8)	Leucemia T-LGG	1 mes (rango 1-8 meses)	2.7 (rango 1.6-4.7)
154	11:3	48.5 (35-66)	TPH	9.1 % (14)	Leucemia T-LGG	No reportado	3.0 (rango 1.6-6.0)

Adaptado de *Qiu Z-Y et al.*,⁴²

Abreviaturas: F: femenino, LGG: Linfocitos grandes granulares, M: masculino.

1.3.2 Etiopatogenia de las expansiones persistentes de linfocitos T citotóxicos tras alo-TPH

La causa final de esta expansión de linfocitos no está completamente aclarada. Existe controversia en cuanto a si representa una verdadera neoplasia secundaria o simplemente una reacción fisiológica mantenida. Tampoco se conoce cuál es el factor desencadenante de la aparición de esta expansión persistente de linfocitos, se contemplan

variables como, una estimulación antigénica crónica debida a infección vírica, a la EICR, y/o a la disminución de la vigilancia inmune secundaria a los tratamientos inmunosupresores.^{43,44} Otros autores proponen un mecanismo en dos fases, con una proliferación inicialmente policlonal, que posteriormente se convierte en monoclonal debido a eventos secundarios como, por ejemplo, la reactivación de CMV.⁴⁵

Infecciones víricas:

Algunos virus como el CMV se han asociado con expansiones de LGG. *Mohty et al.*, describieron como, en el momento exacto de la infección por CMV, no existían células linfoides anormales en las extensiones de sangre periférica; siendo la mediana de tiempo entre la infección por CMV y la detección del expansión de LGG de 336 días (rango 66-399 días).⁴² Sin embargo, en el momento del diagnóstico de la linfocitosis LGG, ningún paciente presentaba una infección por CMV concurrente.³⁸ A pesar de que en este estudio el tiempo descrito entre la reactivación del CMV y el desarrollo de la expansión es, en ocasiones, bastante largo, los propios autores postulan la posibilidad de que expansiones latentes se originaran con la reactivación de CMV y que solo posteriormente se hicieron cuantitativamente detectables. La seropositividad para CMV IgG era mayor en pacientes con presencia de expansión LGG que en aquellos que no la presentaron tras el alo-TPH de progenitores hematopoyéticos.⁴⁶ En otro estudio reciente, 9 de 14 pacientes con expansión LGG (64%) habían presentado previamente una reactivación de CMV frente a 43 de 201 pacientes (24%) entre los que no generaron dicha expansión.⁴⁷ En relación con otros virus, el hecho de que no se haya detectado ADN del VEB en muestras de pacientes diagnosticados de leucemia de LGG tras alo-TPH, junto a que las células T no expresan de manera habitual el receptor CD21 frente al VEB sugieren que este microorganismo no tenga un papel predominante en el desarrollo de estas expansiones tras alo-TPH.^{48,49} *Sabnani et al.*, comunicaron la negatividad de los test de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) frente al Virus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1) en pacientes que presentaban LGG-T tras trasplante de órganos sólidos.³⁹

Alo-antígenos del inóculo

En los receptores de trasplante, los virus no son la única fuente de estimulación antigénica constante; sino que ésta puede inducirse por las células del inóculo. Los

antígenos ajenos procedentes del inóculo del donante pueden servir como desencadenantes de la expansión LGG. Sin embargo, este mecanismo patogénico encuentra un argumento robusto en contra en las series descritas de expansión de LGG tras trasplante autólogo de PH donde los antígenos ajenos no están presentes.^{50,51,52,53}

Enfermedad Injerto Contra receptor (EICR)

La relación entre la expansión de LGG y la EICR está debatida. *Kim et al.*, mostraron una asociación estadísticamente significativa entre aquellos paciente que presentaban una linfocitosis LGG y el desarrollo de EICR crónica.⁴⁶ En otro estudio, esa relación se alcanzó en aquellos pacientes que habían desarrollado EICR aguda.⁴⁷ Sin embargo, otros estudios no han encontrado este tipo de asociaciones.⁵¹

Terapia inmunosupresora

Un efecto no deseado de la inmunosupresión es la pérdida de los mecanismos innatos de defensa que previenen el desarrollo de enfermedades linfoproliferativas.⁵⁴

Mohty et al., en uno de sus estudios mostraron que la linfocitosis LGG era más frecuente en pacientes que habían recibido un régimen de acondicionamiento de intensidad reducida (4 de 49 pacientes) frente a aquellos que recibían un régimen tradicional mieloablativo (2 de 152).³⁸ Los autores proponen dos explicaciones a este fenómeno. Por un lado, un acondicionamiento de intensidad reducida podría conducir a un equilibrio inmune que favorezca la aparición de linfocitos citotóxicos. Por otro lado, este tipo de regímenes permite el injerto con una menor toxicidad relacionada con el procedimiento, pero este contexto se asocia con una tasa mayor de infecciones vírica.⁵⁵

Expansiones de clones T LGG procedentes del donante.

Se ha descrito, de manera esporádica, la transmisión de células tumorales del donante al receptor tras el trasplante de órgano sólido.⁵⁶ La primera descripción de una leucemia LGG derivada de células del donante tras un alo-TPH de MO fue descrito en 2003 en un paciente con leucemia mieloide crónica, en el que análisis de quimerismo en ADN demostró que los LGG expandidos tenían su origen en las célula del donante de médula ósea.⁵⁷ Muy recientemente, se ha descrito el caso de un niño con 16 años con linfoma T periférico que desarrolló una leucemia de LGG en las células del donante tras

alo-TPH. Este niño se presentó clínicamente con una neutropenia persistente y esplenomegalia, nueve meses tras el trasplante, con un quimerismo completo en SP.⁵⁸

1.4. Mutaciones en *STAT3* y *STAT5b* en la patogénesis de la leucemia de linfocitos grandes granulares.

El diagnóstico de la leucemia de LGG sigue siendo un reto clínico debido a diversas causas: 1) su relativa baja incidencia; 2) la posibilidad de que exista una población anómala con cifras de linfocitos normales; 3) la similitud citológica entre LGG neoplásicos y reactivos y, 4) la citopenia asociada a la leucemia de LGG puede ser atribuible a múltiples causas. Esto explica que, históricamente, esta enfermedad se ha considerado infradiagnosticada.

La leucemia de linfocitos grandes granulares (LLGG) es una enfermedad crónica, bien de linfocitos T CD3+ citotóxicos de fenotipo maduro o bien de células NK CD3- que infiltran la sangre y la médula ósea.⁵⁹ La edad mediana al diagnóstico es de 60 años, y la prevalencia estimada representa un 2-5% de las enfermedades linfoproliferativas crónicas en un estudio realizado en Estados Unidos.⁶⁰ El diagnóstico, de acuerdo con la clasificación de 2008 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se basa en la presencia de linfocitos grandes granulares en sangre periférica ($>0.5 \times 10^9/L$) y, en el caso de la LLGG-T, la presencia de un reordenamiento clonal del receptor de la célula T (TCR).⁶¹ La revisión de 2016 de la OMS no ha introducido cambios relevantes en el diagnóstico de esta entidad y se mantiene la división, según la estipe de origen de la célula leucémica, en leucemia de linfocitos grandes granulares T y la enfermedad con linfoproliferación crónica de células NK.⁶² La presencia de rasgos clínicos y hematológicos característicos como la anemia, neutropenia, y la asociación con trastornos autoinmunes (la más frecuente, con la artritis reumatoide) sirven de apoyo al diagnóstico.

Como hemos comentado, las células de la LLGG-T muestran un fenotipo efector maduro de memoria. En condiciones normales, las células en este estadio acaban entrando en apoptosis programada mediante inducción de la muerte celular programada.⁶³ La hipótesis predominante contempla que, tras la expansión de LGG derivada de la respuesta inmune provocada por un antígeno, la regulación aberrante en una serie de vías de señalización hace que esa población clonal activada persista, y resista las señales apoptóticas mediadas por FAS.⁶⁴⁻⁶⁷ Una de las proteínas claves implicadas en este

proceso es la traductora de señal y activadora de la transcripción 3, conocida por sus siglas en inglés como STAT3. Se ha comprobado cómo los LGG leucémicos expresan de manera constitutiva STAT3 fosforilada (forma activa), mientras que la inhibición de STAT3 desencadenaba su apoptosis.⁶⁴ La base molecular que explica estas alteraciones se encontró recientemente, al identificarse la presencia recurrente de mutaciones adquiridas, con ganancia de función, en el gen *STAT3* en el 40 al 70% de las LLGG-T y en el 30% de las LLGG de estirpe NK.^{68,69} Además, en una proporción menor de pacientes, el gen *STAT5b* puede presentar mutaciones adquiridas con similares consecuencias patogénicas.⁷⁰

1.4.1. Las vías de señalización de STAT3 y STAT5b

Tanto *STAT3* como *STAT5b* se encuentran en el cromosoma 17, en regiones cercanas del brazo largo. Las proteínas que codifican son factores de la transcripción, localizándose en el citoplasma celular como monómeros latentes. La estructura de ambas proteínas es muy parecida y se compone de 5 dominios (**Figura 3**): hélice superenrollada, de unión a ADN, de enlace, con homología en el producto del oncogén src (SH2) y el de activación de la transcripción (TAD).⁷¹ STAT3 se puede encontrar como dos isoformas: STAT3 alfa y una forma truncada, STAT3 beta, que carece del dominio TAD y que parece ejercer un efecto dominante negativo, además de otras funciones propias.⁷² *STAT5b* no posee distintas isoformas, pero comparte más de un 90% de homología de secuencia a nivel proteico con STAT5a.⁷³

Los activadores más importantes que ambas proteínas STAT tienen aguas arriba son diferentes citoquinas, factores de crecimiento y tirosín-quinasa citoplasmáticas.⁷⁴ En una secuencia típica de la cascada de activación, tras el estímulo de los receptores de citoquinas, las kinasas *Janus* fosforilan un residuo único de tirosina (Tyr705 en STAT3 o Tyr699 en STAT5b), desencadenando un cambio conformacional requerido para la dimerización de la proteína a través de la interacción recíproca entre el dominio SH2 y el residuo tirosina fosforilado. Los dímeros fosforilados se desplazan al núcleo, uniéndose a los motivos de consenso en el ADN, provocando la activación de una serie de vías aguas abajo implicadas en la apoptosis, ciclo celular, proliferación, transformación celular e inflamación.^{75,76} Se ha sugerido que la fosforilación del residuo Ser727 de STAT3 podría afectar la actividad transcripcional de la forma dimerizada de la proteína, modulación que

dependería del contexto celular.⁷⁷ Las vías de activación aguas abajo son específicas del tipo celular y, aunque los reguladores aguas arriba de STAT3 y STAT5b son distintos, si nos basamos en los datos procedentes de un experimento de ChIPSeq, el 90% de los sitios de unión de STAT5 están co-ocupados por STAT3 en los linfocitos T.⁷⁸ La activación de STAT3 y STAT5b es reversible a través de la acción de una fosfatasa, la supresora de señalización de citoquinas (SOCS), y de diversas familias de proteínas inhibidoras de STAT (PIAS).⁷⁹

1.4.2. STAT3 en linfocitos, cáncer y autoinmunidad

STAT3 es esencial para el desarrollo, como demuestra que la ausencia absoluta de *STAT3* provoca letalidad temprana durante el periodo embrionario en modelo murino.⁸⁰ Por otro lado, el bloqueo dirigido de la función de *STAT3* en los linfocitos T da lugar a alteraciones en la supervivencia celular mediada por interleuquina 6 (IL-6) y a una respuesta proliferativa reducida al estimular con interleuquina 2 (IL-2).^{81,82} En humanos, las mutaciones germinales heterocigotas en los dominios SH2 y de unión al ADN de *STAT3* se han descrito en pacientes con síndrome de hiper-IgE. Esta condición, también llamada síndrome de Job, se caracteriza por presentar infecciones recurrentes por estafilococos, eczema, neumonías cavitadas y niveles elevados de IgE en suero. La hipótesis más establecida considera que esas mutaciones heterocigotas heredadas afectan la función de *STAT3* siguiendo un patrón dominante-negativo: se ha visto como las células mononucleadas extraídas de pacientes con síndrome de hiper IgE responden de manera deficiente a la estimulación con IL-6, y que la co-expresión de la proteína *STAT3* mutada con la silvestre en diferentes líneas celulares da lugar a una unión al ADN y capacidad transcripcional aberrantes.^{83,84}

Las tirosín-quinazas suelen estar activadas al alza en cáncer debido a alteraciones genéticas y/o epigenéticas y la activación de *STAT3* se ha descrito en numerosas neoplasias como un mecanismo secundario, provocado fundamentalmente por una activación autónoma de la IL-6 y la kinasa src. Los efectos de la activación constitutiva de *STAT3* depende del tipo celular y de las proteínas sobre las que se ejerce: la activación de *STAT3* aumenta la transcripción de proteínas anti-apoptóticas como BCL-XL y MCL1, previene que el ciclo celular se detenga por acción de MYC y regula a la baja la transcripción de *TP53*.⁸⁵ La activación aberrante de *STAT3* ha sido descrita en tumores de cabeza y cuello, en mieloma múltiple, en cáncer de mama y en numerosas neoplasias hematológicas.⁸⁶⁻⁹⁰ Sin embargo, y a

pesar del uso de secuenciación de alto rendimiento con cobertura de todo el genoma en grandes series de pacientes, en ninguna de estas patologías se habían encontrado mutaciones adquiridas en *STAT3* hasta 2012.^{91,92}

Bromber et al., establecieron el potencial oncogénico de *STAT3*. Crearon una molécula, *STAT3C*, que dimerizaba (y por tanto se activaba) de manera espontánea. Esta proteína quimérica era capaz de transformar los fibroblastos independientemente de su estado de fosforilación, lo que provocaba que dieran lugar a tumores en el modelo murino.⁹³

Además de en neoplasias, la activación persistente y anómala de *STAT3* también ha sido descrita en numerosas enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes. *STAT3* es necesaria para una correcta respuesta inmune mediada por linfocitos T Th-17, y la función aberrante de esta vía ha sido descrita en artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple y enfermedad de Crohn.⁹⁴⁻⁹⁸

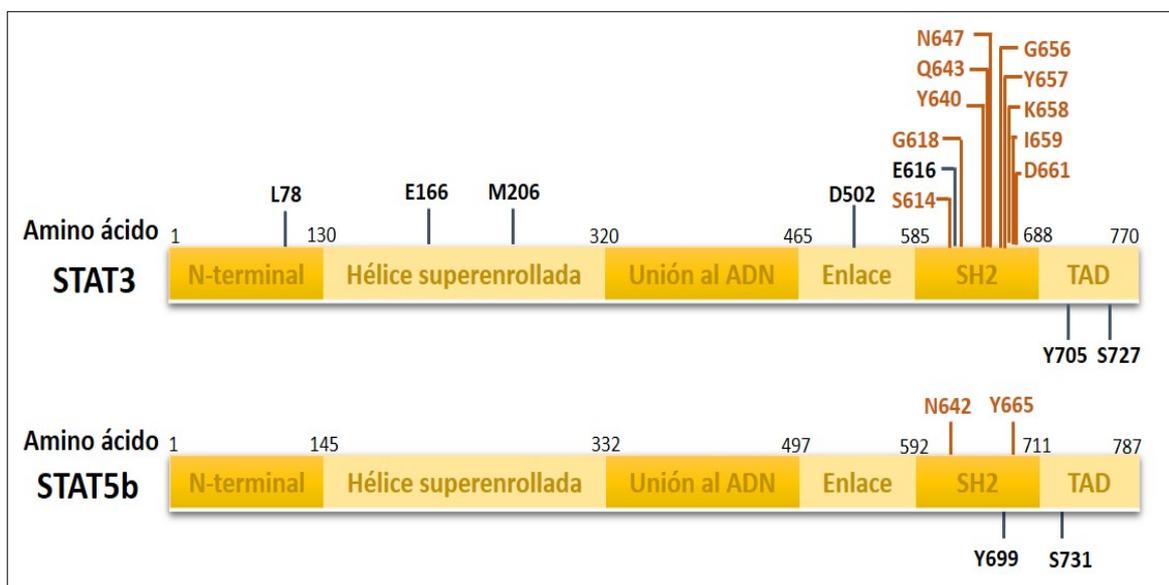
1.4.3. Mutaciones somáticas en *STAT3* en LLGG y otras neoplasias

Los linfocitos de la LLGG expresan de manera constitutiva la forma activa de *STAT3* y, en ellos, la inhibición de *STAT3* lleva a un descenso de la expresión de *MCL-1* y a la recuperación de la sensibilidad a la señal pro-apoptótica mediada por FAS.⁶⁴ La causa principal de esta activación persistente anómala se descubrió en 2012, cuando se encontraron mutaciones adquiridas en *STAT3* en cerca del 70% de las LLGG-T y del 30% al 40% de las LLGG-NK.^{68,69,99,100} Las mutaciones más frecuentes fueron Y640F y una serie de diversas mutaciones *missense* en el codón D661. A destacar, el hecho de que los porcentajes de pacientes con mutaciones en *STAT3* fue muy variado entre los distintos estudios, sobre todo en el contexto de la LLGG-T. En uno de los estudios, las mutaciones fueron más frecuentes en aquellos pacientes que mostraban una expansión marcada de un solo clon LGL.⁶⁹ Algunos de los pacientes incluidos en esos estudios presentaban varias expansiones clonales de tamaño pequeño, lo que quizás podría explicar esa relativa discrepancia en la frecuencia de pacientes mutados en las distintas cohortes, al no alcanzar las poblaciones mutadas el tamaño necesario para la sensibilidad de la técnicas de secuenciación *Sanger* utilizadas, de un 20% aproximadamente.

Las mutaciones detectadas en la LLGG se localizan en los exones 20 y 21 del dominio SH2 de *STAT3*, y son distintas de las mutaciones con pérdida de función descritas

en el síndrome de hiper-IgE. Tomando como base estudios funcionales, en las LLGG *STAT3* está fosforilada de manera espontánea y persistente, lo que confiere a estas células un grado de transcripción génica mayor comparadas con aquellas sin mutación.^{68,69,101} Los efectos de la mutación Y640F han podido ser estudiados en un modelo murino: su expresión forzada condujo al desarrollo de neoplasias mieloproliferativas en un modelo de xenotrasplante, sin que se observaran alteraciones en los compartimentos T o NK.¹⁰²

Figura 3. Dominios de *STAT3* y *STAT5b* y localización de las principales mutaciones adquiridas.



Adaptado de *Rajala et al.*,¹⁰³

También se han encontrado mutaciones adquiridas en la vía de *STAT3*-IL-6 en los adenomas inflamatorios hepatocelulares: un 60% de estos tumores presentan mutaciones activadoras en la IL-6, y el 12% de los casos que no tienen mutaciones en IL-6, presentan una mutación en *STAT3*.¹⁰⁴ De las alteraciones descritas, hay dos tipos que se presentan con el mismo cambio aminoacídico que las descritas en LLGG (K658Y y Y640F). En otros tipos de neoplasia también se han descrito este tipo de mutaciones adquiridas, pero de manera mucho menos común. Así, la secuenciación de linfomas anaplásicos de célula grande ALK-negativos y de linfomas T periféricos CD30+ encontró mutaciones en *STAT3* en 2 de 18 y 2 de 8 casos, respectivamente.¹⁰⁰ En otro estudio, la frecuencia de

mutaciones en *STAT3* fue de 2 de 79 (2,5%) casos en linfoma difuso de célula grande B y 4 de 258 casos (2%) en una serie de diversos tipos de linfomas T.^{100,105}

1.4.4. STAT3 como diana terapéutica en LLGG

Los pacientes con LLGG se tratan en la actualidad con agentes inmunosupresores linfotóxicos como el metotrexato (MTX), ciclosporina (CyA) o ciclofosfamida (CY). Aunque la enfermedad es indolente, la mayoría de los pacientes necesitará tratamiento en algún momento del curso evolutivo debido a anemia, neutropenia o manifestaciones autoinmunes. La tasa de respuesta global para el MTX, que ha sido usado como primera línea por la mayoría de los centros, es de aproximadamente un 50% en series retrospectivas de pacientes, siendo frecuentes las recaídas si se interrumpe el tratamiento.⁶⁰

STAT3 es una diana terapéutica potencial no sólo en cáncer, sino también en enfermedades autoinmunes. Inhibidores específicos de *STAT3*, con capacidad para unirse al dominio SH2 han mostrado resultados prometedores en estudios preclínicos. Un compuesto oral, BP-1-102, mostró ser capaz de inhibir el crecimiento de células tumorales de cáncer de mama y pulmón en cultivos celulares y modelos de xenotrasplante murino, al bloquear la fosforilación, impidiendo la dimerización de la proteína.¹⁰⁶ Otro inhibidor, OPB-3122, fue capaz de reducir el crecimiento del tumor en líneas celulares de leucemia aguda sin afectar el desarrollo de la hematopoyesis normal.¹⁰⁷ También se han propuesto otras estrategias para inhibir *STAT3*, basadas en el uso de oligonucleótidos “señuelo”, que tienen como diana el dominio de unión a ADN y bloquean el paso de la proteína *STAT3* al núcleo.¹⁰⁸

1.5. Proceso de aféresis de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica.

1.5.1. Obtención y Procesamiento de progenitores hematopoyéticos.

El TPH constituye, hoy en día, una terapéutica establecida para gran variedad de enfermedades que afectan al sistema hematopoyético, ya sean congénitas o adquiridas.

Los progenitores hematopoyéticos de sangre periférica (PHSP) han reemplazado a los de MO, siendo en la actualidad la principal fuente de estas células. Esto se debe a varias ventajas: recolección sin anestesia general, eliminación de las múltiples aspiraciones óseas de médula ósea,^{109,110} así como una recuperación hematológica e inmunológica más rápida en el receptor,¹¹¹⁻¹¹³ con escaso impacto en la recaída y la supervivencia global. Además, la incidencia de complicaciones (cáncer, enfermedades autoinmunes, y trombosis) es similar tras donaciones de MO y de SP.¹¹⁴

En condiciones normales existe un escaso número de estos progenitores circulando en SP, constituyendo solo el 0,05 % de los leucocitos. Por ello, el objetivo de la movilización es lograr la proliferación y liberación de los PH desde el compartimento medular hacia la SP. Dicho proceso puede lograrse a través de la administración de diversas citocinas o factores de crecimiento hemopoyético (G-CSF, GM-CSF, SCF, G-CSF pegilado, ADM1300 y otros) solos o en combinación con quimioterapia, aprovechando en este último caso la fase de recuperación tras la mielosupresión.¹¹⁵ El régimen de movilización elegido debe ser determinado por la enfermedad de base y el tipo de donante.

Las células madre se identifican en la circulación mediante la determinación del marcador celular de superficie CD34, usando la citometría de flujo (CMF). La dosis óptima a infundir no está claramente establecida y varios factores pueden determinarla: el tipo de trasplante, la manipulación posterior de esos progenitores que puede condicionar una pérdida importante de los mismos, e incluso el tipo de acondicionamiento.

1.5.2. Cuantificación y número óptimo de progenitores.

El número de PH infundidos es un importante predictor del éxito de un trasplante. Es posible estimar la dosis de éstos con diferentes procedimientos, con diferencias evidentes en cuanto a complejidad, rapidez, disponibilidad, reproducibilidad y coste. Sin embargo, el factor fundamental para decidir cuál es la técnica más adecuada ha de ser su eficacia a la hora de predecir la precocidad del injerto hematopoyético.

Los estudios iniciales acerca del potencial hematopoyético de las células infundidas se basaban en la capacidad funcional de éstas, mediante experimentos tediosos de cultivos

celulares *in vitro* y de transferencia *in vivo*. En 1985, se consiguió un avance mayor con el descubrimiento de un anticuerpo monoclonal, CD34. CD34 es una glicoproteína con dominios extracelulares e intracitoplasmáticos que se expresan en células progenitoras hematopoyéticas, de manera que permite identificarlas y por tanto cuantificarlas de forma rápida mediante CMF. Sin embargo, esta es una medida grosera de las células madre hematopoyéticas, ya que solo 1 de cada 1000 células CD34+ será una verdadera célula *stem*. Aproximadamente, el 0,1% de las células mononucleadas (CMN) de SP y entre el 1% y el 4% de las de MO expresan el antígeno CD34.

Está demostrado que la cantidad de células CD34+ infundidas se correlaciona de forma positiva con la cinética del injerto, tanto a corto como a largo plazo, pero una dosis insuficiente puede producir un fallo de injerto, por lo que es de vital importancia para el éxito de un trasplante establecer un umbral de células CD34+ recolectadas.

La experiencia con trasplantes autólogos y alogénicos ha mostrado éxito en el injerto y reconstitución inmune a largo plazo con un mínimo de $2 \times 10^6/\text{kg}$ y $4 \times 10^6/\text{Kg}$ de células CD34+, respectivamente.^{12,116} En el trasplante alogénico, con acondicionamiento MA, sobre todo en el caso del trasplante HLA no idéntico o de donante no emparentado, dosis bajas de células CD34+ se asocian al riesgo de fallo de injerto, resultando en una menor supervivencia en casos de infusión $< 2.7 \times 10^6$ células CD34+/Kg.¹¹⁷ Sin embargo, dosis elevadas ($> 8 \times 10^6$ células CD34+/kg) también se han relacionado con una menor supervivencia, sobre todo en relación con un mayor riesgo de EICR.¹¹⁸⁻¹²¹

1.5.3. Movilización y aféresis de PH

En condiciones normales existe un escaso número de PH en sangre periférica, por ello es preciso llevar a cabo la movilización de éstos desde la médula ósea. Esto lo conseguimos con la ayuda de citoquinas como son los factores estimulantes de colonias. A pesar de existir diversos tipos, el más utilizado, por su eficacia y buena tolerancia, es el factor de crecimiento de colonias granulocíticas (G-CSF).

Los elementos que afecta a la movilización del donante son: a) la edad del donante (cuanto mayor edad peor movilización),^{122,123} b) pauta de movilización de los factores de crecimiento (son preferibles dos administraciones frente a una sola al día),^{124,125} c) sexo

del donante (varón, mejor colecta), d) niveles basales de CNT (mayores niveles, mejor) y e) el tipo de G-CSF empleado (mejor lenograstin).¹²⁶

La movilización de donantes sanos se lleva a cabo con G-CSF a dosis de 5 a 15 mcg/Kg/día (generalmente 5 mcg/Kg/12h, pero se debe considerar más dosis si el peso del donante es mucho menor que el del receptor) desde 4-5 días antes de la aféresis, momento en el que se produce el pico máximo de movilización de estas células. En el caso de que la aféresis fuera insuficiente, a pesar de ser una indicación fuera de ficha técnica, existe suficiente evidencia que apoye que los donantes sanos pueden recibir plerixafor, un modulador de los receptores de la quimocinas CXCR4 y CXCR7 provocando la movilización de las células madre.¹²⁷

El día previo a la aféresis y el mismo día de ésta, se realizará un recuento de CD34+ en SP por CMF para garantizar una colecta eficiente. Si el recuento de CD34+ el día de la aféresis se encuentra entre 30-100 CD34+/microlitro casi siempre se asegura una colecta correcta ($> 2.5 \times 10^6/\text{Kg}$ de CD34+); en el caso de que fuera mayor de 30/microlitro habría que plantear una aféresis de gran volumen o la posibilidad de que el donante requiera más de un día de colecta. Si la cifra de CD34+ es inferior a 10/microlitro por lo general no se inicia la aféresis.¹²⁸

La obtención de PHSP se realiza mediante procesadores celulares de aféresis. Estos equipos son capaces de separar componentes sanguíneos de forma automática y en un sistema cerrado. Con una adecuada movilización, los separadores con mejor eficiencia de recolección pueden recolectar la dosis celular necesaria para el trasplante en un periodo de tiempo no muy prolongado con volúmenes procesados inferiores a 3 volemias y en un solo procedimiento.

Actualmente se utilizan dos tipos de sistemas para la recolección PH: procesadores semi-automatizados y sistemas plenamente automatizados (**tabla 3**).

El sistema Spectra Optia® MNC (Terumo BCT) empleado en nuestro centro, incluye sensores ópticos para la monitorización automática continua y estabilización de la interfaz, y la monitorización de la línea de flujo de recolección, así como un sistema novedoso que está diseñado para reducir la pérdida de plaquetas.

Tabla 3. Las principales características de los dos sistemas de aféresis utilizados en este estudio: COBE Spectra® hasta 2015, Spectra Optia® de 2015 en adelante.

	COBE Spectra®	Spectra Optia®
Compañía	TerumoBCT (Lakewood, Co)	TerumoBCT (Lakewood, Co)
Tipo de Flujo	Continuo	Continuo
Separación de sangre	Separación continua de los componentes sanguíneos	Separación continua de sangre supervisada por la gestión automática de la interfaz
Colecta de PHSP	Colecta continua de la capa de células mononucleares	Colecta en una cámara de recolección y conducción durante ciclos.
Ajuste del operador	Ajuste continuo manual de la interfaz y de la colecta	Control automático de la interfaz y de la colecta con algunos ajustes

Nota: Una técnica modificada automática de COBE Spectra también ha sido desarrollada con el nombre de Auto-PBSC. Adaptado de *Hequet et al.*,¹²⁹

Distintos estudios han comparado las características técnicas de los dispositivos (**Tabla 4**).¹³⁰⁻¹³⁶ Desarrollaron índices para caracterizar el rendimiento de los dispositivos durante la colecta. El principal índice es la eficiencia de colección (CE). También fueron analizados otros índices como la pérdida de plaquetas o hemoglobina, la duración de la aféresis y la contaminación con células no-CD34+.¹³³⁻¹³⁵ Los CEs son similares en ambos sistemas, con una menor pérdida de plaquetas en el donante en caso del Optia, que también se asoció a unas sesiones de aféresis más prolongadas.

Tabla 4. Estudios recientes comparando las características técnicas de los dispositivos de aféresis para la recolección de PHSP.

Referencias (año)	Objetivo	Número de procedimientos	Resultados
Altuntas et al., (2007)¹³¹	Compara las cualidades técnicas de Amicus y COM.TEC	Amicus: 20 COM.TEC: 20	No diferencias en el número de células CD34+ recolectadas. Elevada pérdida de plaquetas de SP con COM.TEC
Reinhardt et al., (2011)¹³²	Comparación Spectra Optia con el histórico de funcionamiento de COBE spectra	Spectra Optia: 35 COBE Spectra: 401	Facilidad de uso superior del Spectra Optia CE2 superior con Spectra Optia
Wu et al., (2012)¹³⁰	Copara la colecta de PHSP utilizando COBE Spectra, MCS+ Haematonetics and Baxter Amicus	COBE Spectra: 99 MCS+: 81 Amicus: 38	Número similar de células CD34+ recolectadas. Mejor correlación de recolección/PHSP circulantes con COBE Spectra. Amicus recolectó menos plaquetas
Brauninger et al., (2012)¹³⁶	Compara las características de Optia y COBE Spectra	Spectra Optia: 50 COBE Spectra: 89	Con Optia: CE: 7.9% mayor - Menos plaquetas en el producto, pero mayor número de granulocitos.
Flommersfeld et al., (2013)¹³³	Compara COM.TEC, COBE Spectra and Spectra Optia	COM-TEC: 77 Spectra Optia: 52 COBE Spectra 58	Con Optia: CE más elevado- Menor duración
Ikeda et al., (2013)¹³⁴	Compara las características de Spectra-MNC (manual) y Spectra auto-PBSC	Spectra-Auto: 118 Spectra-MNC: 70	En Spectra-MNC: Correlación entre los PHSP circulantes y los recolectados. En Spectra-Auto: menos pérdida de plaquetas en SP
Cherqaoiu et al., (2014)¹³⁵	Compara las características técnicas en Spectra Optia y COBE Spectra en niños de bajo peso	Spectra Optia: 8 COBE Spectra: 22	CE similar. menor pérdida de plaquetas y hemoglobina con Spectra Optia pero mayor duración.
Lozano et al., (2014)¹³⁷	Compara las características técnicas de Spectra Optia y COBE Spectra en fotoaféresis	Spectra Optia: 100 COBE Spectra: 100	No diferencias pre y post aféresis en el recuento de leucocitos, CMN, eritrocitos y de plaquetas. CE similar. Menor contaminación de eritrocitos y plaquetas en Spectra Optia pero mayor número de leucocitos no planificados.

Adaptado de *Hequet et al.*,¹²⁹

Nota: Dos índices de eficiencia de colección (CE) son descritos: CD34+ CE1 (%)= número absoluto de células CD34+ recolectadas (x100%)/ ([niveles de CD34+ en sangre pre-aféresis + niveles en sangre de CD34+ post-aféresis]/2) x volumen total procesado; CD34+ CE2 (%) = número absoluto de células CD34+ recolectadas (x100%)/ niveles en sangre de CD34+ pre-aféresis x volumen total procesado.

Abreviaturas: CMN: células mononucleadas, PHSP: progenitores hematopoyéticos de sangre periférica, SP: sangre periférica.

Es necesario conectar por vía venosa periférica o a través de un catéter central al donante al separador células, mediante un equipo de bolsas y tubos de recolección estériles y utilizando un anticoagulante de forma continua, habitualmente el citrato. La sangre anticoagulada llega al separador, donde se procesa y selecciona el producto que se va a recolectar; el resto de la sangre es devuelta al donante.

El número de progenitores recolectados va a depender fundamentalmente de la concentración de dichos progenitores en sangre periférica, de la eficiencia de recolección del separador, pero también del volumen de sangre procesada. Habitualmente se procesan entre 2 y 3 volemias del donante o paciente, proceso que dura unas 4-6 horas, dependiendo del flujo de extracción/retorno de sangre y de la capacidad de sujeto para tolerar el procedimiento. En ocasiones, cuando el número de progenitores circulantes no es muy elevado, se plantea la realización de aféresis de grandes volúmenes con el fin de incrementar la recolección de los mismos. En este caso se aprovecha el hecho de que la colecta de CD34+ se mantiene constante en las primeras 6 volemias procesadas.

La recolección de PH puede producir efectos secundarios derivados de dos factores fundamentales: la propia extracción de los PH o como consecuencia de la necesidad de colocación de un catéter central en aquellos sujetos que carezcan de un adecuado acceso venoso periférico.

Utilizando los separadores celulares de flujo continuo, los efectos secundarios de los procedimientos de aféresis, suelen ser escasos y leves. Los más frecuentes son:¹³⁸

1. Hipocalcemia: ésta se produce como consecuencia de la utilización de citrato como anticoagulante, ya que este produce quelación del calcio. Los síntomas de hipocalcemia suelen iniciarse como sensación de parestesias o entumecimiento en los labios y yemas de los dedos, y ocasionalmente progresa a náuseas, espasmo musculares e incluso tetania. La primera medida ante estos síntomas es reducir el flujo

de entrada. Se pueden dar suplementos de calcio oral o intravenoso si fuera preciso. En aquellos centros que trabajan con grandes volúmenes, se asocia heparina al citrato como anticoagulante, para disminuir la aparición de la hipocalcemia grave si se quiere mantener el flujo alto.

2. Hipotensión y episodios vaso-vagales secundarios a la hipovolemia. Suelen presentarse en forma de episodios vaso-vagales leves o moderados como mareos, sudoración y/o síncope y suelen ceder con la suspensión momentánea del procedimiento y la administración de sueroterapia intravenosa.
3. Derivados de la venopunción: dolor, hematomas o pequeñas hemorragias en las zonas de punción. Son los más frecuentes y normalmente poco importantes.

1.6. Impacto clínico de la distribución de las poblaciones linfocitarias en el inóculo.

Los progenitores hematopoyéticos movilizados a sangre periférica son la fuente más común para la realización de alo-TPH.¹³⁹ En comparación con los inóculos de médula ósea, la cantidad de linfocitos T, progenitores CD34+ y monocitos, junto a otros subtipos celulares, es mayor en el caso de los inóculos obtenidos de sangre periférica.^{111,113,140}

Varios estudios han sugerido que la composición celular del inóculo de sangre periférica es capaz de modular la dinámica del injerto e influir en el desarrollo de determinados eventos clínicos post-trasplante.

1.6.1. CD34+

En alo-TPH con acondicionamiento MA, la dosis infundida de CD34+ se ha relacionado de manera consistente con una mejora en el injerto y con el éxito del procedimiento en términos de supervivencia, independientemente de la fuente de obtención de los PH.^{141,142} En alo-TPH con acondicionamiento de IR de sangre periférica, con donante hermano compatible, se ha comunicado que un número mayor de CD34+ infundidas se asocia a un injerto más precoz y a una menor tasa de fallos de injerto.¹⁴³ Un estudio reciente, con más de 1000 procedimientos, validó estos resultados.¹⁴⁴ Éste último

estudio, sin embargo, no consiguió reproducir esa asociación en el caso de donante no familiar, un hecho ya comunicado previamente.¹⁴⁵

Los estudios que han analizado la relación entre la cantidad de células CD34+ infundidas y el desarrollo de EICR han mostrado conclusiones contradictorias. En el contexto de la EICR aguda, *Przepiorka et al.*, en un análisis de 160 adultos trasplantados con inóculo de SP de hermano HLA idéntico y acondicionamiento MA, encontraron una asociación independiente entre mayores dosis de células CD34+ y el desarrollo de EICR aguda.¹⁴⁶ Sin embargo, un estudio posterior de una serie de pacientes de similares características encontró una relación con una mejoría de los eventos de supervivencia, pero no con el desarrollo de EICR.¹⁴¹ Esta falta de asociación también fue comunicada en el contexto del alo-TPH de IR con HLA idéntico.¹⁴⁷

Cantidades elevadas de progenitores CD34+ en el inóculo de SP se han asociado a un aumento en el riesgo de EICR crónica en el contexto de alo-TPH de hermano HLA idéntico con acondicionamiento MA¹²⁰ y con un aumento de riesgo de EICR crónica severa en el caso del acondicionamiento de IR.¹⁴⁸ Recientemente, una dosis elevada de linfocitos CD3+ y de CD34+ se mostraron como factor de riesgo del desarrollo de EICR crónica en una serie de pacientes con LAM sometidos a alo-TPH de DNE con acondicionamiento de IR, sin que los niveles aumentados de esas dos poblaciones celulares del inóculo impactaran en una menor tasa de recaídas.¹⁴⁹

1.6.2. Linfocitos T

Los inóculos deplecionados de linfocitos T disminuyen la tasa de EICR, sin embargo, estudios han mostrado una mayor tasa de recaídas que en el caso de inóculos no manipulados tras alo-TPH MA.^{150,151} También se ha comunicado y validado una mayor incidencia de fallos de injerto con el uso de inóculos de SP deplecionados de células T.¹⁵²

1.6.3. Linfocitos T CD8+

La relevancia clínica de la cantidad de linfocitos CD8+ infundidos ha sido motivo de investigación por varios grupos. La mayoría de los trabajos en el contexto de alo-TPH mieloablativo no encontró correlación con eventos clínicos y, además, la depleción exclusiva de los linfocitos T CD8+ tampoco mostró una reducción de la EICR.^{148,153-155}

Sin embargo, en series sometidas a alo-TPH de IR se han descrito hallazgos relevantes. En un estudio incluyendo pacientes sometidos a IR con dosis bajas de irradiación corporal total y fludarabina, una dosis elevada de linfocitos T CD8+, fue la única de las variables de la distribución inmune del inóculo que mostró significación independiente en el estudio multivariante respecto de una supervivencia libre de enfermedad más prolongada.¹⁴³ El hecho de que solo en una minoría de los pacientes incluidos en este estudio la enfermedad de base fuera una leucemia aguda mieloide, limita la generalización de sus conclusiones.

Reshef et al., describieron como una mayor cantidad de células T CD8+ en el inóculo movilizado de SP era capaz de predecir, de manera significativa, un menor riesgo de recaída y una supervivencia más prolongada en pacientes con neoplasia hematológica sometidos a un acondicionamiento de IR. Esta asociación era independiente del riesgo de la enfermedad de base.¹⁵⁶ Además, los autores concluyen que sus datos sugieren que la supervivencia global tras alo-TPH de IR se puede mejorar seleccionando donantes no familiares de edad joven, cuyos niveles de CD8+ en el inóculo sean más elevados que en el donante hermano.

En un contexto diferente, un estudio reciente incluyendo 200 pacientes adultos sometidos a trasplante de cordón mieloablativo mostró como una mayor cantidad de células CD8+ en el inóculo se relacionaron de manera significativa e independiente con un injerto mieloide y plaquetar más temprano, y con una supervivencia libre de enfermedad y global más prolongada.¹⁵⁷

1.6.4. Células natural killer CD56+

La función de las células NK, depende de un equilibrio entre señalizaciones activadoras e inhibitoras.¹⁵⁸ El repertorio de subtipos celulares ha mostrado ser muy heterogéneo entre individuos, lo que en población general se asocia a la susceptibilidad de sufrir infecciones víricas.^{159,160} Sin embargo, sólo recientemente se ha comenzado a investigar acerca de la importancia de la dosis en el inóculo de los subtipos de células NK y su potencial impacto clínico.

1.6.5. Otras poblaciones del inóculo

Otros autores, han comunicado cómo la cantidad total de células nucleadas en el inóculo es una medida con mejor capacidad discriminativa que la cantidad de CD34+ en relación a eventos relacionados con supervivencia/progresión post-trasplante.¹¹

1.7. El compartimento CD56^{bright} dentro de las células *natural killer*

A lo largo del tiempo las células NK han sido consideradas simplemente células asesinas relativamente primitivas. Sin embargo, el conocimiento adquirido de su biología durante las últimas décadas ha llevado a un cambio de paradigma, siendo ahora consideradas no solo agentes genuinos de la inmunidad innata, sino también células importantes que dan forma e influyen las respuestas inmunitarias adaptativas, de tal manera que cada vez se les reconoce un papel inmunorregulador clave.

Las células NK no son una población homogénea, si no que existen varias subpoblaciones tanto en humanos como en ratones. Históricamente, la primera descripción de las diferentes subpoblaciones de células NK fue facilitada por Nagler *et al.*,¹⁶¹ en 1989, y sus datos han sido confirmados por otros grupos. En humanos constituyen aproximadamente el 15% de los linfocitos totales en sangre periférica y pueden ser definidas cinco subpoblaciones basándonos en la expresión relativa de los marcadores CD16 (o FcγRIIIA, receptor de baja-afinidad para la porción Fc de la inmunoglobulina G) y CD56 (molécula de adhesión que media la adhesión homotípica):
162,163,164

- 1) CD56^{bright} CD16⁻ (50-70% de las CD56^{bright})
- 2) CD56^{bright} CD16^{dim} (30-50% de las CD56^{bright})
- 3) CD56^{dim} CD16⁻
- 4) CD56^{dim} CD16^{bright}
- 5) CD56⁻ CD16^{bright}.

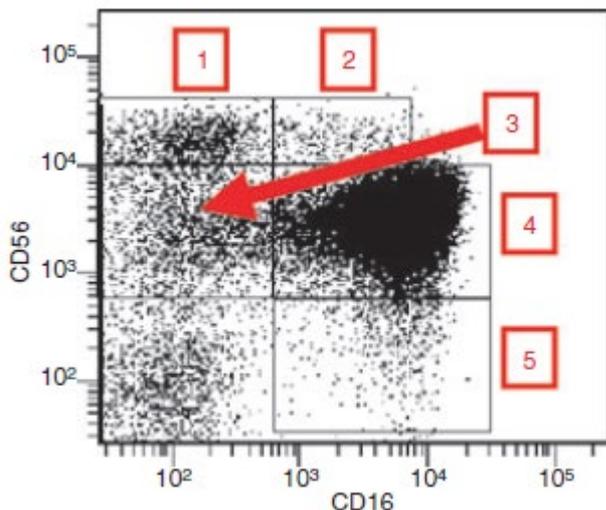
En individuos sanos, las células NK CD56^{dim} CD16^{bright} es la mayor subpoblación circulante en sangre periférica representando, al menos, el 90% de las células NK, mientras que menos del 10% son células NK CD56^{bright}, siendo minoritarias otras

poblaciones celulares como $CD56^{dim} CD16^{-}$ y $CD56^{-} CD16^{bright}$. La mayoría de células NK $CD56^{bright}$ se encuentra en órganos linfoides secundarios.^{162,164}

En rasgos generales se ha postulado que las células NK $CD56^{bright}$ producen diversas citoquinas como interferón- γ (INF- γ) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y tienen una función predominantemente inmunorreguladora. Al contrario, las células NK $CD56^{dim}$ expresan perforina, granzima β y gránulos citolíticos, por lo que su función es fundamentalmente citotóxica.¹⁶⁴ La eliminación de células inmunes activadas es uno de los mecanismos por los que las células NK ejercen su función inmunomoduladora, eliminando células T $CD4^{+}$ activadas (y no en reposo). Este efecto citolítico lo llevan a cabo fundamentalmente las células $CD56^{dim}$ (el compartimento más citolítico) pero también las $CD56^{bright}$, especialmente tras ser activadas por IL-2.¹⁶²

Las distintas subpoblaciones son fácilmente distinguidas por CMF como se muestra en la **Figura 4**.¹⁶⁵

Figura 4. Subpoblaciones de células NK humanas basadas en la expresión relativa de CD16 y CD56. Imagen de *Aurélie Poli et al.*,¹⁶⁵



Al teñir CMN de SP normales con anticuerpos anti-CD16, y adquiriendo células $CD3^{-} CD19^{-}$ (células NK), se diferenciaron 5 subpoblaciones basadas en la expresión de CD16 frente a CD56. 1) $CD56^{bright} CD16^{-}$; 2) $CD56^{bright} CD16^{dim}$; 3) $CD56^{dim} CD16^{-}$; 4) $CD56^{dim} CD16^{+}$; 5) $CD56^{-} CD16^{+}$.

1.7.1. Células NK CD56^{bright} en sangre periférica

Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de células NK CD56^{bright} se encuentran en los órganos linfoides secundarios y tan solo una pequeña fracción en sangre periférica. Las células NK CD56^{bright} han sido comparadas con las células NK CD56^{dim} CD16^{bright} en términos de fenotipo y funciones y también con respecto a sus características en cuanto a su capacidad para migrar y asentarse en diferentes tejidos.

Características fenotípicas propias del compartimento NK CD56^{bright}

Los receptores inhibidores *killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIR) y *immunoglobulin-like transcript 2* (ILT2) están ausentes en las células NK CD56^{bright} pero los podemos encontrar en diversas proporciones (según los receptores y los individuos) en las células NK CD56^{dim}.^{162,166} CD94/NKG2A, otro receptor inhibidor mayor, se expresa en una fracción de las células NK CD56^{dim} y, con una mayor densidad de expresión, en todas las células CD56^{bright}.¹⁶² CD94 es una molécula chaperona que también puede estar asociada a NKG2C, el cual es un receptor activador. Ambas isoformas (CD94 / NKG2A y CD94 / NKG2C) reconocen al antígeno leucocitario humano no-clásico, molécula de clase I HLA-E, que es capaz de presentar péptidos derivados de secuencias de señales de moléculas clásicas del HLA clase I.^{162,164,167} Con respecto al receptor activador NKp46, su densidad suele ser más alta en la población CD56^{bright}.¹⁶⁸ Sólo las células CD56^{bright} expresan el marcador de células madre hematopoyéticas CD117 (c-kit) y el receptor de alta afinidad para la IL-2 y proliferan en respuesta a concentraciones picomolares de esta citoquina. También proliferan de manera eficiente en respuesta a la interleuquina 21 (IL-21).¹⁶⁹ Otros receptores de citoquinas, como el receptor I de IL-1 (IL1-R1) y el de interleuquina 18 (IL-18), también se expresan en un nivel superior en esta subpoblación (**Tabla 5.1 y 5.2**).¹⁶²

El repertorio de receptores de quimioquinas es completamente diferente entre las dos poblaciones. Las células CD56^{bright} son las únicas que expresan CCR7 y portan CXCR3 a una densidad significativamente mayor que las células NK CD56^{dim}.^{162,170}

Por el contrario, éstas últimas expresan CXCR1 y CX3CR1 exclusivamente.^{162,170} Con respecto a las moléculas de adhesión, las células NK CD56^{bright} muestran una expresión más intensa de CD2, CD11c, CD44, CD49e, CD54, CD62L, mientras que las células NK CD56^{dim} expresan más CD11a (**Tabla 5.1 y 5.2**).¹⁶² Como consecuencia de estos diferentes repertorios de receptores de quimioquinas y moléculas de adhesión las propiedades migratorias de estos subtipos celulares son divergentes: la subpoblación CD56^{bright} migra preferentemente a órganos linfoides secundarios, mientras que las células CD56^{dim} migran a lugares donde se producen procesos inflamatorios agudos.^{162,170} A diferencia de las células CD56^{dim}, la subpoblación de células CD56^{bright} carece de la expresión de CD57 y CD160,^{171,172} pero muestra las proteínas reguladoras CD55 y CD59 en un nivel mayor.¹⁷³ Además, la subpoblación CD56^{bright} es HLA-DR⁺ (**Tabla 5.1 y 5.2**).¹⁷¹

Las diferencias fenotípicas entre ambas subpoblaciones se han confirmado y ampliado mediante *arrays* genómicos y proteómicos.^{174,175} *Wendt et al.*, mostraron que las poblaciones de células NK en reposo difieren en la expresión de 473 transcritos, 176 se expresan exclusivamente en células CD56^{dim} y 130 exclusivamente en células CD56^{bright}.¹⁷⁵

Tabla 5.1. Comparación fenotípica entre las células NK CD56^{bright} y CD56^{dim}.

Adaptado de *Poli et al.*,¹⁶⁵

	CD56 ^{bright}	CD56 ^{dim}
CD56	++	+
CD16	±	++
Receptores Inhibidores		
KIR	-	+
ILT2	-	+
CD94/NKG2A	++	±
Receptores Activadores		
NKp46	++	+
CD117 (c-kit)	++	-
Receptores de Citoquinas		
IL-2R $\alpha\beta\delta$	+	-
IL-2R $\beta\delta$	++	+
IL-1RI	++	+
IL-18R	++	+
Receptores de Quimioquinas		
CCR7	++	-
CXCR3	++	±
CXCR1	-	++
CX3CR1	-	++

Tabla 5.2. Comparación fenotípica entre las células NK CD56^{bright} y CD56^{dim}.

Adaptado de *Poli et al.*,¹⁶⁵

	CD56 ^{bright}	CD56 ^{dim}
Moléculas de Adhesión		
CD2	++	±
CD11c	++	±
CD44	++	+
CD49e	++	+
CD54	++	±
CD62L	++	±
CD11a	+	++
Otras moléculas		
CD57	-	+
CD160	-	++
CD55	++	+
CD59	++	+
HLA-DR	+	-

Funciones propias del compartimento NK CD56^{bright}

La actividad citotóxica de las células NK CD56^{dim} es significativamente más alta que la de las células CD56^{bright},^{161,162} lo que se refleja en un mayor contenido en perforina, granzimas y gránulos citolíticos.¹⁶⁶ El alto nivel de expresión de CD16 en las células NK CD56^{dim} las convierte en mediadores eficientes de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Las células NK CD56^{bright} CD16^{dim} llevan a cabo su función citotóxica dependiente de anticuerpo solo débilmente, mientras que las células CD56^{bright} CD16⁻ NK carecen de esa función.^{161,162} Tras la estimulación con citoquinas como IL-2 o IL-12, la actividad citotóxica de todas las subpoblaciones de células NK aumenta drásticamente.^{161,162}

Con respecto a la producción de citoquinas la situación se invierte. De hecho, las células NK CD56^{bright} son las productoras de citoquinas más eficientes.¹⁶² Las principales

citoquinas liberadas son INF- γ (las células NK son una de las fuentes más importantes de esta citoquina), TNF- α , Factor estimulante de colonias granulocito-macrófago, IL-10 e IL-13.¹⁷⁶

1.7.2. Células NK CD56^{bright} en órganos linfoides secundarios

En el bazo, del 7 al 50% de las células mononucleares son células NK, la mayoría con un fenotipo CD56^{dim} CD16⁺.¹⁷⁷ Probablemente corresponden a la misma población descrita en sangre periférica, que simplemente circula a través de la pulpa roja.¹⁷⁷ Entre las células mononucleares en los ganglios linfáticos, el 1-5% son células NK,^{177,178} cuya distribución de subpoblaciones es una imagen especular de la que se encuentra en la sangre periférica. De hecho, del 75% a más del 95% son del tipo CD56^{bright}.^{177,178} Estas células se localizan en las zonas parafoliculares de los ganglios linfáticos.¹⁷⁸ Considerando que los ganglios linfáticos contienen el 40% de todos los linfocitos del cuerpo (en contraste con el 2% en sangre periférica), el mayor reservorio de las células NK está en los ganglios linfáticos y no en la sangre, y hay muchas más células NK CD56^{bright} que CD56^{dim}.¹⁷⁹ La gran mayoría de las células NK de las amígdalas también son CD56^{bright}.¹⁷⁷

Las células NK CD56^{bright} del ganglio linfático muestran un fenotipo ligeramente diferente a las de sus homólogas en sangre. Carecen no solo de CD16 y KIR, sino también de CD8, CD62L, CCR7, el receptor activador NKp30 y HLA-DR. CD94 / NKG2A y NKp46 están presentes solo en una fracción de estas células.^{177,179}

Las células NK CD56^{bright} de la amígdala comparten el fenotipo de las células NK de los ganglios linfáticos. Sin embargo, en las amígdalas inflamadas, se activan NKp44⁺ CD69⁺ HLA-DR⁺.^{177,179} Antes del descubrimiento de esta subpoblación, la expresión de NKp44 solo se había observado in vitro en células NK activadas con IL-2.¹⁸⁰

Como las células NK de los ganglios linfáticos están en contacto con las células T,¹⁷⁸ se ha investigado el efecto de la IL-2 derivada de las células T sobre estas células NK. Esta citoquina regula al alza o induce, respectivamente, la expresión de CD16, KIR, NKp46 y NKp30, así como de perforina, terminando con un fenotipo cercano al de las células CD56^{dim} CD16⁺ de sangre periférica.¹⁷⁷ El fenotipo de células NK de órganos linfoides secundarios aisladas ex vivo sugiere la ausencia de actividad citotóxica, y este

es, en efecto, el caso.¹⁷⁷ Sin embargo, el cultivo en IL-2 no solo cambia el fenotipo, sino que también induce una actividad citotóxica eficiente.¹⁷⁷ Además, las células NK de las amígdalas inflamadas producen INF- γ y el 35% de ellas proliferan tras el cultivo en IL-2.^{177,179}

1.7.3. Interacción de las células NK CD56^{bright} y otras células del sistema inmune

Las interacciones bidireccionales entre las células NK y las células dendríticas han sido ampliamente investigadas y revisadas. En particular, las células CD56^{bright} CD16⁻ proliferan preferentemente en co-cultivos con células dendríticas inmaduras y lipopolisacáridos y son capaces producir de forma abundante INF- γ .¹⁸¹ En vivo, las células NK CD56^{bright} interactúan en los ganglios linfáticos con células dendríticas que provienen de la periferia.¹⁷⁹

En sitios de inflamación periférica, las células NK CD56^{bright} representan un 40-60% de todas las células NK y exhiben un fenotipo activado (CD69⁺).¹⁸² Tras la estimulación con monoquinas (IL-12, IL-15, IL-18), producen INF- γ y aumentan significativamente el porcentaje de monocitos productores de TNF- α . En este tipo de interacción bidireccional, se requiere un contacto físico directo entre las células NK y los monocitos para lograr un efecto máximo.¹⁸²

1.7.4. Relación entre las células NK CD56^{bright} y CD56^{dim}

Según *Caligiuri*,¹⁶⁴ los precursores de las células NK abandonan la médula ósea, transitan por la sangre periférica y se alojan en el ganglio linfático donde se diferencian en células NK CD56^{bright} bajo la influencia de citoquinas producidas por células estromales y células dendríticas.

Una cuestión que se ha debatido durante mucho tiempo es la naturaleza precisa de la relación entre las dos subpoblaciones principales de células NK, CD56^{bright} y CD56^{dim}. ¿Las células NK CD56^{bright} son precursoras de las células CD56^{dim}, o es cada

compartimento un grupo de células finalmente diferenciadas sin relación directa y que surgen de dos células precursoras hematopoyéticas diferentes?

A favor de la primera hipótesis, se ha propuesto que las propiedades fenotípicas y funcionales de ambas subpoblaciones definen más bien las células NK CD56^{bright} como precursores inmaduros y a las células NK CD56^{dim} como células finalmente diferenciadas. La maduración se caracterizaría por la regulación negativa de CD56, la adquisición de CD16 y de KIR; y las células CD56^{bright} CD16^{dim} serían una etapa intermedia entre los tipos de células más inmaduras (CD56^{bright} CD16⁻) y las más maduras (CD56^{dim} CD16⁺).^{161,183}

Sin embargo, como las células NK CD56^{bright} producen mayores cantidades de citoquinas que las células NK CD56^{dim}, y poseen un repertorio completamente diferente de moléculas de adhesión y receptores de quimioquina que conducen a diferentes propiedades de migración,^{162,170} es concebible también el concepto de dos poblaciones celulares diferenciadas terminalmente.

Tres artículos recientes han demostrado finalmente, de manera bastante convincente, que las células NK CD56^{bright} son, muy probablemente, células precursoras de la subpoblación CD56^{dim}.¹⁸⁴⁻¹⁸⁶ De hecho, las células NK CD56^{dim} muestran telómeros más cortos que las células NK CD56^{bright} de sangre periférica y de los ganglios linfáticos, lo que implica que estas últimas son menos maduras que las primeras. Además, las células NK CD56^{bright} CD16⁻ purificadas, cultivadas en presencia de fibroblastos sinoviales o de la piel, pueden diferenciarse en células CD56^{dim} que tienen las características fenotípicas y funcionales características de las células NK CD56^{dim} de sangre periférica.¹⁸⁴ Se ha demostrado que la interacción entre CD56 y el factor-1 del receptor de crecimiento de fibroblastos tiene un papel clave en este proceso de diferenciación.¹⁸⁴ Como argumento para la diferenciación de células NK CD56^{bright} en células NK CD56^{dim} en ganglios linfáticos in vivo, *Romagnani et al.*,¹⁸⁵ muestran que la linfa eferente y los ganglios linfáticos altamente reactivos contienen una proporción sustancial de células NK CD56^{dim} KIR⁺.

1.8. Células NK CD56^{bright}: expansión y reducción en patología humana

1.8.1. Expansión de células NK CD56^{bright} en patología humana

En donantes sanos, no más del 10% de todas las células NK de SP suelen ser CD56^{bright}. Sin embargo, expansiones por encima de este bajo porcentaje se han descrito durante la reconstitución del sistema inmune después del trasplante de médula ósea, donde los primeros linfocitos que aparecen en sangre son células NK CD56^{bright}.¹⁸⁷ Esta población también aumenta en pacientes tratados diariamente con una dosis baja de IL-2.¹⁸⁷

Cada vez son más los artículos que describen expansiones de células NK CD56^{bright} en diferentes enfermedades:

El déficit del transportador asociado al procesamiento de antígenos (TAP) en una patología que se caracteriza biológicamente por una muy baja expresión superficial de moléculas HLA de clase I y, en la clínica, por infecciones respiratorias crónicas, bronquiectasias y úlceras cutáneas profundas. En dos casos de TAP se ha demostrado que las células NK CD56^{bright} se encuentran incrementadas representando el 37% y el 54%, respectivamente, de todas las células NK de SP.¹⁸⁸ Mientras que, los pacientes asintomáticos con deficiencia de TAP mostraban porcentajes normales de células NK CD56^{bright}.¹⁸⁸ Estos hallazgos fueron confirmados recientemente, aunque en menor grado, en un nuevo caso de deficiencia de TAP.¹⁸⁹

Por otro lado, también se han encontrado porcentajes elevados de células NK CD56^{bright} en series de individuos con vasculitis o con enfermedades respiratorias de otros orígenes, siendo el porcentaje de células NK CD56^{bright} superior al 10% (12,60-25,52%) en aproximadamente un tercio de ellos.¹⁸⁸ Estos datos sugieren que la expansión de las células NK CD56^{bright} no es un sello distintivo de la deficiencia de TAP, sino que puede ocurrir en varias enfermedades con diversos orígenes.

*Cac y Ballas*¹⁹⁰ presentaron el caso de una mujer con verrugas periungueales refractarias y resistentes al tratamiento. La CMF reveló que el 13-30% de sus linfocitos (y no de sus células NK, lo que hace que la expansión sea muy relevante) fueron CD56^{bright} y solo el 0.83% de los linfocitos fueron CD56^{dim}. Además, la paciente presentaba una reducción severa en la citotoxicidad mediada por células NK. Tras recibir

tratamiento con interferón alfa (INF- α) las verrugas casi desaparecieron y se restableció la citotoxicidad de las células NK, mientras que disminuyó la proporción de células NK CD56^{bright}. Es bien conocido que INF- α estimula la citotoxicidad de las células NK, pero tal vez también favorezca la maduración de las células NK hacia la etapa CD56^{dim} y en el caso de esta paciente el proceso probablemente había sido bloqueado antes de la introducción de INF- α , por razones completamente desconocidas.

Una situación inversa fue descrita por *Saraste et al.*, que trataron a un grupo de 11 pacientes con esclerosis múltiple con interferón beta (INF- β) y observaron una expansión de células NK CD56^{bright} con una disminución paralela de células CD56^{dim} después de 12 meses de tratamiento ($14.7 \pm 2.5\%$ de todas las células NK eran CD56^{bright}).¹⁹¹

En otra serie de 22 pacientes con esclerosis múltiple se administró un tratamiento combinado con INF- β y Daclizumab. Daclizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra la cadena α del receptor IL-2 (CD25) que ha demostrado eficacia en la estabilización de la esclerosis múltiple en ensayos clínicos.¹⁹² También en este caso, se observó una expansión de las células NK CD56^{bright}, que se correlacionó con una reducción en la inflamación cerebral durante el tratamiento.¹⁹³ El mecanismo de acción muy probablemente corresponde a una regulación positiva de CD122 (cadena β del receptor de IL-2) y como consecuencia con una mejor respuesta a IL-2 endógena. *In vitro*, las células NK de los pacientes inhibieron la proliferación de células T de una manera dependiente de contacto y, por lo tanto, son consideradas como células NK reguladoras por los autores. Un estudio que utilizó Daclizumab en cinco pacientes con uveítis activa confirmó la eficacia terapéutica del tratamiento y la expansión selectiva de células NK CD56^{bright} a lo largo del tiempo (incrementando entre 4 a 20 veces su número).¹⁹⁴ Las células NK CD56^{bright} produjeron altas cantidades de la citoquina inmunosupresora interleuquina 10 (IL-10), y esta molécula podría estar en el origen del efecto beneficioso al regular negativamente la respuesta autoinmune. Se ha especulado que la secreción de IL-10 mediada por CD56^{bright} explica los efectos terapéuticos en estos tres estudios con Daclizumab. Del mismo modo, la respuesta inmunitaria eficaz contra las verrugas periungueales inducidas por el virus del papiloma humano en el caso descrito por *Cac y Ballas*,¹⁹⁰ podría haberse visto impedida por la producción de IL-10 por las abundantes células NK CD56^{bright}. En este contexto, el concepto de células NK reguladoras ('NKreg') está emergiendo claramente en la literatura^{195,196} y merece más

investigación para comprobar, por ejemplo, si toda la población CD56^{bright} o solo una subpoblación tiene propiedades inmunorreguladoras.

En un caso publicado de encefalopatía necrotizante aguda asociada a virus del herpes humano tipo 6 en un niño pequeño, *Kubo et al.*, también describen una expansión relevante de células NK CD56^{bright} durante la fase de convalecencia. Aquí, los autores postulan que las células NK CD56^{bright} producen altos niveles de citoquinas inflamatorias (de hecho, se encuentran en el suero del paciente) y que un alto porcentaje de estas células es un factor de riesgo para el desarrollo de encefalitis durante la infección por el virus del herpes humano tipo 6.¹⁹⁷

En otra comunicación, un paciente con inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X con manifestaciones similares al síndrome de Omen tenía un aumento de las células NK circulantes (del 50% al 59% de los linfocitos), siendo hasta la mitad de ellas (del 28% al 50%) CD56^{bright} CD16⁻.¹⁹⁸ La piel, que mostraba marcado engrosamiento y eritema severo, estaba infiltrada predominantemente por células CD56^{bright} CD16⁻ NK expresando altos niveles de ARN mensajero, no solo para citoquinas inflamatorias sino también para IL-10.

En una cohorte de pacientes de género femenino infectadas de forma crónica por el Virus de la Hepatitis C (VHC), comparadas con pacientes con infección por VHC resuelta y pacientes controles sanos, el porcentaje total de células NK entre linfocitos se redujo en el primer grupo, mientras que aumentó la proporción de células CD56^{bright} entre el total de células NK.¹⁹⁹ Estas células produjeron mayor cantidad de INF- γ que las células NK CD56^{bright} de los otros dos grupos, y la citotoxicidad global de las células NK no se vio afectada.

Exactamente el mismo patrón, es decir, la reducción del número de células NK pero el incremento del porcentaje de células NK CD56^{bright} se encontró en individuos con un test cutáneo de la tuberculina positivo, comparados con paciente con tuberculosis evidente y controles sanos.²⁰⁰

La importancia de las observaciones de estos dos estudios no está del todo clara. En el caso de la infección por VHC,¹⁹⁹ los autores especulan que las células NK CD56^{bright} podrían contribuir a la polarización de las células T y al daño hepático, y que su expansión sería el resultado de una menor tasa de diferenciación hacia las células CD56^{dim}. Los

sujetos TST+ podrían estar protegidos de la tuberculosis activa por las células NK CD56^{bright} que secretan grandes cantidades de INF- γ .²⁰⁰

Schepis et al.,²⁰¹ describen un incremento en la proporción de células NK CD56^{bright} en el lupus eritematoso sistémico independientemente de la actividad de la enfermedad. Sin embargo, los autores no consideran ni investigan las células CD56^{bright} CD16^{dim}, su estrategia de activación no excluye CD56^{dim} CD16⁻ y, finalmente, como la mayoría de los pacientes tiene uno o más tratamientos al mismo tiempo en el momento de la extracción de sangre, el papel potencial de estos tratamientos en la expansión de células NK CD56^{bright} no es considerado. Sin embargo, el lupus eritematoso sistémico podría añadirse a la creciente lista de enfermedades caracterizadas por una mayor proporción de células NK CD56^{bright}, aunque este tema merece una investigación más detallada.

Aunque desafortunadamente no discriminan entre las células NK CD56^{bright} y CD56^{dim}, tres artículos describen una expansión muy llamativa de las células NK NKG2C⁺ en las infecciones humanas causadas por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y el citomegalovirus. Como una subpoblación de células NK CD56^{bright} expresan NKG2C,²⁰² sería muy interesante su análisis cuantitativo en futuras investigaciones.²⁰³⁻²⁰⁵ Los estudios presentados hasta ahora se refieren a las células NK de sangre periférica, otros describen la presencia de CD56^{bright} en diferentes tejidos durante los distintos estados de la enfermedad.

Las células NK CD56^{bright} CD16⁻ KIR⁻ se encuentran, entre otros tipos de células, dentro de las placas psoriásicas agudas y, tras la estimulación, producen abundante INF- γ .²⁰⁶ En la artritis reumatoide, las proporciones de las diferentes subpoblaciones de células NK en sangre periférica son las mismas que en donantes sanos, pero en el líquido sinovial de los pacientes contiene casi exclusivamente células NK CD56^{bright} KIR⁻.²⁰⁷ Del mismo modo, en la sarcoidosis no se observan diferencias entre los pacientes y controles sanos en sangre periférica, mientras que los primeros tienen más células NK CD56^{bright} en sus líquidos de lavado broncoalveolar.²⁰⁸

1.8.2. Reducción de células NK CD56^{bright} en patología humana

Con una sensible menor frecuencia que en el caso de las expansiones, varios estudios han mostrado que, en algunas enfermedades, el porcentaje de células NK CD56^{bright} está reducido.

En pacientes con enfermedad cardíaca coronaria,²⁰⁹ el número total de células NK se encuentra disminuido así como la actividad citotóxica y, además, hay una tendencia a porcentajes menores de células NK CD56^{bright} en pacientes comparado con los controles sanos. La base argumental para explicar estos hallazgos. fue el hecho de que las infecciones son consideradas un factor de riesgo para enfermedades cardíacas coronarias y que las células NK participan en la respuesta inmune frente a virus y bacterias.

A través del análisis de pequeñas series de pacientes con rinitis alérgica y/o asma, *Scordamaglia et al.*,²¹⁰ encontraron una reducción significativa en el porcentaje de células NK CD56^{bright} comparado con los individuos sin alergia. Las consecuencias son, una producción débil de INF- γ y una interacción con células dendríticas dañada, por lo que, en enfermedades alérgicas, las células NK podrían ser incapaces de desencadenar una inmunidad adaptativa eficaz en la dirección de linfocitos T colaboradores tipo 1.

En la artritis reumatoide juvenil con afectación sistémica al inicio, no solo la actividad citotóxica de las células NK está fuertemente reducida, sino que, en algunos pacientes, ha sido descrita la ausencia total de células NK CD56^{bright}. El mismo fenómeno se ha encontrado previamente en pacientes con síndrome de activación del macrófago y linfocitosis hemofagocítica. Los autores sugieren, sin llegar a demostrarlo, que todas las células NK CD56^{bright} son reclutadas en el lugar de la inflamación. Sería interesante comprobar si en estos pacientes, las células NK CD56^{bright} se encuentran en los ganglios linfáticos o en el líquido sinovial, por ejemplo. Si no es así, habría que preguntarse como las células NK CD56^{dim} pueden producirse en ausencia de precursores CD56^{bright}.²¹¹

Finalmente, Kariminia y colaboradores cuantificaron recientemente una serie de poblaciones inmunes en los productos de donación procedentes tanto de MO como de SP, en ambos casos estimulados con G-CSF. Inicialmente, encontraron asociaciones significativas entre dos poblaciones inmunes y el desarrollo de EICR crónica y de su forma extensa. Tanto la población de linfocitos T CD4⁺ IFN gamma⁺ como la de células

NK reguladoras CD56^{bright} presentaron una relación inversa y significativa con el desarrollo de EICR crónica, sugiriendo su papel regulador del proceso.²¹²

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Este trabajo parte del análisis rutinario de las principales poblaciones inmunes tanto en el inóculo movilizado como en el periodo post-alo-TPH durante las dos últimas décadas dentro del programa de alo-TPH de nuestro centro.

La disponibilidad de ADN y de un seguimiento longitudinal prolongado, tanto clínico como inmunológico, tras alo-TPH nos permitiría validar o no la hipótesis de que las expansiones de linfocitos citotóxicos tras alo-TPH son de naturaleza fisiológica o bien podrían tratarse, al menos en algunos casos, de leucemias de linfocitos grandes granulares.

Por otro lado, el reanálisis de los estudios de CMF de las poblaciones inmunes en el inóculo infundido en alo-TPH, nos permitiría validar o no la hipótesis del valor predictor de una menor cantidad de células *Natural Killer* CD56^{bright} en el inóculo infundido, respecto del desarrollo de EICR crónica durante el seguimiento.

2.1. Objetivo principal capítulo I

Caracterizar la naturaleza de las expansiones de linfocitos T citotóxicos en el adulto a lo largo del periodo post-alo-TPH, mediante la identificación del comportamiento longitudinal de esas expansiones, su relación con eventos clínicos, y sus características fenotípicas y moleculares incluyendo la presencia o no de mutaciones en el dominio SH2 de *STAT3*.

Los objetivos específicos del capítulo I son:

- Caracterización clínica de los pacientes que desarrollan una expansión persistente de linfocitos T citotóxicos, sea esta relativa o absoluta.
- Estudio longitudinal de la dinámica de las expansiones persistentes de linfocitos T citotóxicos.
- Caracterización inmunofenotípica ampliada de pacientes que desarrollan una expansión persistente de linfocitos T citotóxicos, sea esta relativa o absoluta.

- Caracterización molecular, en cuanto a presencia de reordenamiento TCR y presencia de mutaciones adquiridas en *STAT3* de los pacientes que desarrollan una expansión persistente de linfocitos T citotóxicos, sea esta relativa o absoluta.

2.2. Objetivo principal capítulo II

Validar los resultados, recientemente comunicados, acerca del impacto predictor de EICR crónica de la proporción de células $CD56^{bright}$ NK en el inóculo movilizado con G-CSF infundido, explorando la independencia pronóstica de este factor potencial en el contexto de otros parámetros clínicos y de laboratorio.

Los objetivos específicos del capítulo II son:

- Determinación de las principales poblaciones inmunes en el inóculo para el alo-TPH mediante CMF, cuantificando los compartimentos $CD56^{bright}$ y $CD56^{dim}$ dentro de las células NK.
- Validación del valor pronóstico del compartimento NK $CD56^{bright}$ como predictor de desarrollo de EICR crónica, tanto en cohorte seleccionada según criterios del estudio pivotal de referencia, como en cohorte global de alo-TPH movilizados con G-CSF..
- Expansión del estudio pronóstico a modelo multivariante incluyendo principales factores clínicos relacionados con desarrollo de EICR crónica.

CAPÍTULO I:

“Expansiones persistentes de linfocitos T citotóxicos tras trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos: comportamiento longitudinal, impacto clínico y ausencia de mutaciones en *STAT3*”

3. CAPÍTULO I: “Expansiones persistentes de linfocitos T citotóxicos tras trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos: comportamiento longitudinal, impacto clínico y ausencia de mutaciones en *STAT3*”

3.1. Introducción

El alo-TPH es un tratamiento potencialmente curativo tanto para enfermedades malignas como benignas. Sin embargo, las alteraciones que se producen en la reconstitución inmune derivada del donante pueden limitar el éxito del proceso e incrementar tanto el riesgo de infección como el de recaída de la enfermedad en el paciente receptor del trasplante.^{213,214}

El desarrollo de un nuevo sistema inmune puede verse afectado de manera negativa por variables dependientes de la enfermedad, del paciente o del mismo procedimiento de trasplante; e incluye tanto efectos cuantitativos como funcionales.²¹⁵

Al contrario de lo que ocurre con la reconstitución de las células B, la ausencia de un timo funcional impide que la recuperación de la inmunidad T tras alo-TPH imite la ontogenia primaria.^{216,217} La expansión periférica de células T de memoria derivadas del inóculo, sin depender del timo, precede a la expansión de las células T inmaduras provocando una inversión de las ratio CD4+/CD8+ en el periodo temprano tras el trasplante; cifras elevadas de manera mantenida de LTC han sido comunicadas tras trasplante autólogo y alogénico de progenitores hematopoyéticos, tras trasplante de órgano sólido, en algunos casos cumpliendo los criterios diagnósticos actuales de una verdadera LLGG. Sin embargo, ningún estudio hasta la fecha ha considerado para la definición de población persistentemente incrementada tanto criterios absolutos como relativos.^{38,39,47,218} La LLGG, descrita por primera vez hace más de 40 años, es una entidad de difícil diagnóstico diferencial respecto de las linfocitosis fisiológicas reactivas.^{219,59,220}

La descripción reciente de mutaciones somáticas adquiridas en el dominio de dimerización y activación (SH2) del gen traductor de señal y activador de la transcripción 3 (*STAT3*), presentes en un 30 a 40% de los casos de LLGG tanto de estirpe NK como T, puede ayudar a distinguir entre poblaciones linfoides verdaderamente malignas y linfocitosis reactivas en el post-alo-TPH.^{221,69}

3.2. Pacientes, materiales y métodos.

Pacientes

Se incluyeron pacientes que, de manera consecutiva, fueron sometidos a un alo-TPH dentro del programa de trasplante alogénico del servicio de Hematología y Oncología médica del Hospital Universitario Morales Meseguer entre los años 2001 y 2013, que además cumplieron los siguientes criterios:

- i) Que tuvieran al menos una determinación cuantitativa de las subpoblaciones linfocitarias mediante CMF multiparamétrica los días +30, +100 y +365 tras el día de infusión.
- ii) Que el inóculo no fuera manipulado en su composición.
- iii) Los pacientes que experimentaron fallo de injerto primario o secundario fueron excluidos.

Los pacientes que recibieron infusión de linfocitos del donante (ILD) y que cumplían todos los criterios anteriormente citados, fueron censurados en la fecha de ILD. En total incluimos 154 pacientes. Se obtuvo consentimiento informado para el acceso a los datos clínicos de acuerdo a protocolos acordados por el Comité de Ética de investigación clínica del Hospital Universitario Morales Meseguer y a la Declaración de Helsinki.

Establecimos dos definiciones de expansión persistente de linfocitos T citotóxicos que fueron consideradas en el análisis clínico de manera independiente:

- i) eLTC relativa, incluyendo aquellos pacientes cuya ratio entre los linfocitos T CD8+/CD4+ fuera superior a 1,5;
- ii) eLTC absoluta cuando el número de linfocitos T CD8+ superaba los $2 \times 10^9/L$.

En ambos casos esa condición debía persistir por un mínimo de 6 meses. La determinación de la severidad clínica de la EICR aguda y crónica fue determinada de acuerdo con los criterios modificados Seattle-Glucksberg y los de los institutos nacionales de la salud de EEUU (NIH).^{222,223} Se realizó antigenemia semanal de CMV para el seguimiento de la infección por CMV en todos los pacientes.²²⁴ Tan solo aquellos episodios de infección potencialmente asociados a un compromiso clínico, que requirieran terapia específica y/o

ingreso hospitalario, fueron considerados en este estudio, tal y como se definieron previamente.^{225,226} Brevemente, los episodios infecciosos que incluimos fueron: infecciones bacterianas probadas o supuestas basándose en la combinación de la presentación clínica y a la respuesta con tratamiento antibiótico, viremias por CMV y VEB que requirieran tratamiento, y cualquier tipo de infección fúngica invasiva (probada, probable o posible) o parasitaria. La mortalidad asociada a la infección fue definida cuando el evento infeccioso constituyó la causa de muerte primaria, siguiendo las guías recientemente publicadas para la asignación de causa de muerte.²²⁷

Estudios de citometría de flujo y citológicos

La reconstitución de las distintas subpoblaciones inmunes fue medida de manera prospectiva en cada paciente en muestra de sangre periférica fresca. En este panel inmunofenotípico “de rutina” incluimos anticuerpos monoclonales contra CD3, CD4, CD8, CD56, CD19.

En 17 pacientes con una eLTC absoluta persistente llevamos a cabo un estudio ampliado en el que incluimos CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16, CD25, CD56, CD57, CD1a, HLA-DR, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$. Todos los análisis fueron realizados utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur hasta 2007 y un modelo FACSCanto a partir de la fecha anterior.

Todos los anticuerpos monoclonales fueron adquiridos de Becton Dickinson (San José, CA, EEUU). Como parte del diagnóstico, cada análisis de las subpoblaciones de linfocitos por CMF estuvo precedido de un examen citológico de una extensión de sangre periférica.

Análisis del receptor de la célula T mediante reacción en cadena de la polimerasa.

El estudio del reordenamiento del gen del receptor de la célula T (TCR) a partir de SP o MO fue realizado mediante una prueba automatizada de alta resolución por análisis de fragmentos en un secuenciador *ABI 310 genetic analyser* (Applied Biosystem, Foster City CA, EEUU).

Secuenciación directa mediante método Sanger de STAT3.

Las secuencias de nucleótidos utilizadas como cebadores para la secuenciación mediante método Sanger del exón 21 de STAT3 fueron: GCCAGGCCACTGAACAGGGTG (Cebador *Forward*) y TGTTGGGGTGACCGATGGGA (Cebador *Reverse*).

Análisis estadístico

La comparación entre proporciones y rangos de las variables de distinto grupo se realizaron utilizando el test de la chi cuadrado, el test exacto de Fisher, test de Student, o test de U Mann-Whitney, según estuviera indicado. Utilizamos los métodos de Kaplan Meier y Cox en el análisis de la supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de progresión (SLP), considerando significativas los valores de p iguales o inferiores a 0.05 bilaterales. En los modelos Cox examinamos los residuos parciales para asegurar que el supuesto de proporcionalidad de riesgos se cumplía.

3.3. Resultados

Cohorte, frecuencia de las LTC, relaciones clínicas.

Las principales características de los pacientes en el momento del trasplante, tuvieran o no una LTC, quedan resumidas en la **Tabla 6.1.** y **Tabla 6.2.**

La cohorte completa de 154 casos tenía una edad mediana de 42 años con un ligero predominio del género masculino (58%) , y con un número similar de pacientes que habían recibido tratamiento de acondicionamiento de IR (48%) o MA (52%).

Tabla 6.1. Principales características de los pacientes incluidos en el estudio antes de la infusión de PH.

	Total (n=154)	eLTC Relativas (n=75)	Sin eLTC Relativas (n=79)	P	eLTC Absolutas (n=14)	Sin eLTC Absolutas (n=140)	P
Edad media en el Alo-TPH, años (\pm DE)	42 \pm 16	45 \pm 14	39 \pm 17	0,03	52 \pm 11	41 \pm 16	0,02
Género, n(%)							
Masculino	89(58%)	47(63%)	42(53%)	0,2	8(57%)	81(57%)	0,9
Femenino	65(42%)	28(37%)	37(47%)		6(43%)	59(43%)	
Enfermedad, n(%)							
LAM+SMD	68(44%)	37(49%)	31(39%)	0,2	9(64%)	59(42%)	0,1
Otras	86(56%)	38(51%)	48(61%)		5(36%)	81(58%)	
Estado al Alo-TPH, n(%)							
1ª RC	72(47%)	38(51%)	34(43%)	0,3	8(57%)	64(46%)	0,3
Otra	82(53%)	37(49%)	45(57%)		6(43%)	76(54%)	
Alo-TPH previo, n(%)	26(17%)	12(16%)	14(18%)	0,5	1(7%)	25(17%)	0,3
Régimen de acondicionamiento, n(%)							
MA	79(52%)	32(43%)	47(60%)	0,04	7(50%)	72(52%)	0,3
IR	75(48%)	43(57%)	32(40%)		7(50%)	68(48%)	
TBI, n(%)	49(32%)	24(32%)	25(31%)	0,9	5(36%)	44(31%)	0,7
Donante, n(%)							
Emparentado	119(77%)	51(68%)	67(84%)	0,02	9(64%)	109(78%)	0,5
No emparentado	35(23%)	24(32%)	12(16%)		5(36%)	31(22%)	
HLA, n(%)							
Idéntico	133(86%)	65(87%)	68(86%)	0,9	13(93%)	120(86%)	0,8
No idéntico	21(14%)	10(13%)	11(14%)		1(7%)	20(14%)	

Abreviaturas: Alo-TPH: Trasplante Alogénico, DE: Desviación Estándar, eLTC: expansiones de linfocitos T citotóxicos, IR: intensidad reducida, LAM: Leucemia Aguda Mieloblástica, MA: Mieloablativo, RC: Remisión Completa, SMD: Síndrome Mielodisplásico. TBI: Irradiación corporal total.

Nota: En negrita, los valores de p considerados significativos en el univariante: $p < 0,150$.

Tabla 6.2 Principales características de los pacientes incluidos en el estudio: infusión y seguimiento.

	Total (n=154)	eLTC Relativas (n=75)	Sin eLTC Relativas (n=79)	P	eLTC Absolutas (n=14)	Sin eLTC Absolutas (n=140)	P
Fuente del inóculo, n(%)							
SP	136(88%)	66(88%)	70(89%)	0,9	11(79%)	125(89%)	0,2
MO	18(12%)	9(12%)	9(11%)		3(21%)	15(11%)	
CD34+(x10 ⁹ /Kg) infundidos (mediana,IQR)	4,5(3,5-5,8)	4,5(3,7-6,2)	4,5(3,3-5,6)	0,9	4,2(3,1-5,6)	4,6 (3,4-5,7)	0,4
Profilaxis de EICHa							
Con Timoglobulina	29(18%)	22(29%)	7(9%)	0,001	3(21%)	26(18%)	0,5
Sin Timoglobulina	125(82%)	53(71%)	72(91%)		11(79%)	114(82%)	
Reactivación CMV	59(38%)	39(52%)	20(25%)	0,001	6(43%)	53(38%)	0,4
EICRa	82(53%)	47(63%)	35(44%)	0,02	9(64%)	73(52%)	0,3
EICRa							
0-1	86(56%)	35(45%)	51(64%)	0,04	6(43%)	80(57%)	0,2
≥2	68(44%)	40(53%)	28(36%)		8(57%)	60(43%)	
EICRc	102(66%)	52(69%)	50(63%)	0,9	13(93%)	89(63%)	0,02
EICRc							
0-2	64(41%)	32(43%)	32(41%)	0,5	2(14%)	62(43%)	0,03
2-3	90(51%)	43(57%)	47(59%)		12(86%)	78(57%)	

Abreviaturas: Alo-TPH: Trasplante Alogénico, CMV: Citomegalovirus, ±DE: ± Desviación Estándar, EICRa: Enfermedad Injerto Contra Receptor Aguda, EICRc: Enfermedad Injerto Contra Receptor Crónica, eLTC: expansiones de linfocitos, MO: Médula Ósea, SP: Sangre Periférica.

Nota: En negrita, los valores de p considerados significativos en el univariante: p <0,150.

eLTC relativas.

Una ratio CD8+/CD4+ por encima de 1,5, persistente (con una duración superior a los 6 meses) fue detectada en 75 de los 154 pacientes estudiados, mostrando todos ellos un predominio de LGG en la extensión de SP. Aquellos pacientes que presentaron estas eLTC relativas estaban caracterizados por ser de mayor edad, haber recibido un acondicionamiento de IR, haber recibido ATG como profilaxis de la EICR aguda, recibir un inóculo de DNE, y por presentar dos eventos clínicos en el post TPH temprano: la reactivación del CMV y el desarrollo de una EICR aguda grave (Tabla 6.1 y 6.2) . Tan solo un caso de neutropenia, transitoria, sin ningún tipo de relevancia clínica fue descrita en este grupo de paciente con eLTC. Este episodio de neutropenia alcanzó niveles por

debajo de $1 \times 10^9/L$, se inició en el día +100 y se resolvió sin ningún tipo de intervención en el día +180.

Cuando tomamos en consideración el número de episodios infecciosos relevantes en cada uno de los periodos post-TPH (**Tabla 7**), hubo más episodios en el grupo de los pacientes que desarrollaron eLTC en el periodo temprano post-alo-TPH. Fundamentalmente, presentaron más infecciones fúngicas entre los días 0 y +41 ($p=0,02$) y víricas (todas reactivaciones de CMV) entre los días +41 y +180 ($p= 0,03$). No encontramos diferencias significativas a partir del día +180.

Los 17 pacientes con eLTC relativa que sufrieron una infección fúngica invasiva dentro de los primeros 40 días tras la infusión presentaron cifras más bajas de células NK, CD8+ y CD4+ en el día +30 desde la infusión comparados con el resto de la cohorte pero sólo la diferencia entre los linfocitos CD4+ alcanzó la significación estadística ($0,129$ vs. $0,238 \times 10^9/L$, $p=0,02$).

Tabla 7. Eventos infecciosos clínicamente relevantes según el periodo post-alo-TPH en función de la presencia o ausencia de eLTC relativas o absolutas. En cada celda: número de eventos infecciosos; número de pacientes con, al menos, un episodio infeccioso relevante/número de pacientes que permanecen en seguimiento al final del periodo.

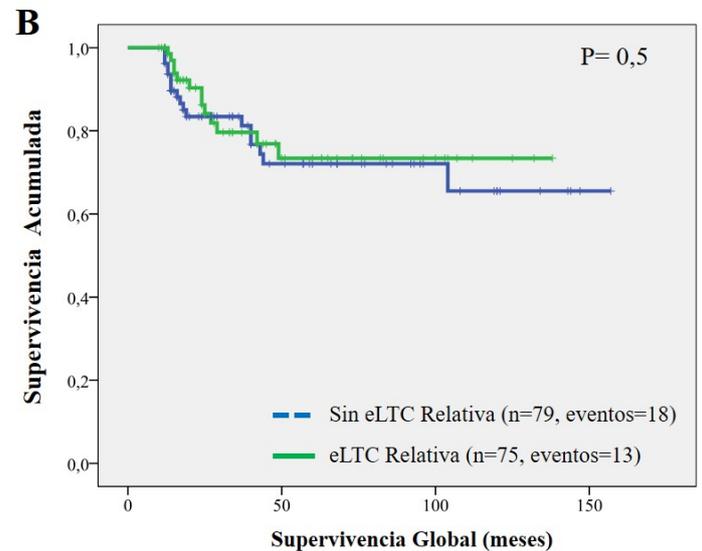
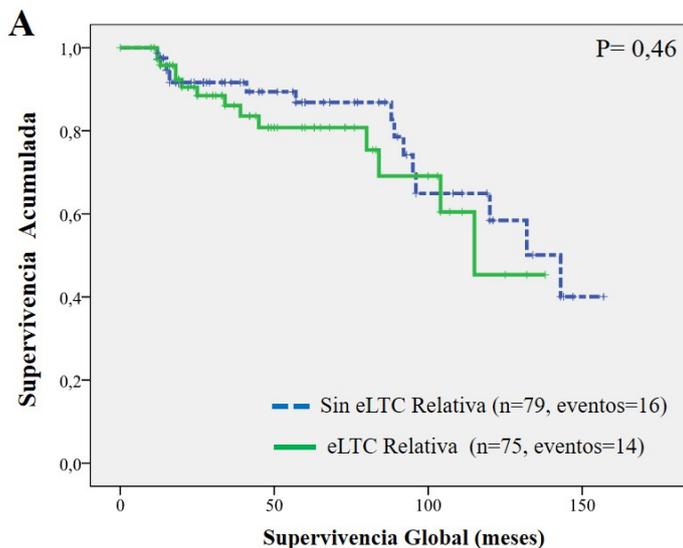
Periodo	Total	Pacientes con eLTC relativas (n=75)	Pacientes sin eLTC relativas (n=79)	p	Pacientes con eLTC absoluta (n=14)	Pacientes sin eLTC absolutas (n=140)	P
0-40 días							
Total	161; 115/154, (74%)	85; 61/75, (81%)	76; 54/79, (69%)	0.06	18; 11/14, (77%)	141; 104/140, (74%)	0.7
Bacterianas	115; 103/154, (66%)	58; 52/75 (69%)	57; 51/79, (64%)	0.67	15; 10/14, (71%)	102; 93/140, (66%)	0.7
Virales	23; 20/154, (13%)	10; 8/75, (11%)	13; 11/79, (14%)	0.5	3; 2/14, (14%)	20; 18/140, (13%)	0.4
Fúngicas	23; 22/154, (15%)	17; 16/75, (21%)	6; 6/79, (8%)	0.02	2; 2/14, (14%)	21; 20/140 (14%)	0.4
Parasitarias	0	0	0	NT	0	0	NT
41-180 días							
Total	49; 39/154, (26%)	34; 23/75, (30%)	21; 16/79, (21%)	0.09	6; 2/14, (14%)	33; 37/140, (26%)	0.5
Bacterianas	20; 13/154, (8%)	11; 8/75, (11%)	9; 5/79, (9%)	0.3	3; 2/14, (14%)	13; 11/140 (8%)	0.3
Virales	25; 22/154, (14%)	17; 15/75, (20%)	8; 7/79, (9%)	0.03	2; 2/14, (14%)	23; 20/140, (14%)	0.6
Fúngicas	8; 8/154, (5%)	5; 5/75, (7%)	3; 3/79, (4%)	0.4	1; 1/14, (7%)	7; 7/140, (5%)	0.7
Parasitarias	1/154	1/75	0/79	NT	0/14	1/140	NT
181-365 días							
Total	30; 24/154, (16%)	13; 10/75, (13%)	17; 14/79, (18%)	0.4	3; 2/14, (14%)	27; 22/140, (16%)	0.8
Bacterianas	14; 11/154, (7%)	6; 4/75, (5%)	8; 7/79, (9%)	0.5	1; 1/14, (7%)	13; 10/140, (7%)	0.3
Virales	8; 7/154, (5%)	3; 3/7, (4%)	5; 4/79, (6%)	0.3	1; 1/14, (7%)	7; 6/140, (7%)	0.3
Fúngicas	7; 7/154, (5%)	4; 4/75, (5%)	3; 3/79, (4%)	0.7	1; 1/14 (7%)	6; 6/140, (4%)	0.4
Parasitarias	1/154	0/75	1/79	NT	0/14	1/140	NT
366-730 días							
Total	17; 16/128, (13%)	8; 7/61, (11%)	9; 9/67, (13%)	0.8	2; 2/11, (18%)	15; 14/117, (12%)	0.8
Bacterianas	10; 9/128, (7%)	5; 4/61, (7%)	5; 5/67, (7%)	0.7	1; 1/11, (9%)	9; 8/117, (7%)	0.4
Virales	5; 5/128, (4%)	2; 2/61, (3%)	3; 3/67, (4%)	0.8	0; 1/11, (0%)	5; 5/117, (4%)	0.5
Fúngicas	2; 2/128, (2%)	1; 1/61, (1%)	1; 1/67, (1%)	0.9	1; 1/11, (9%)	1; 1/117, (1%)	0.17
Parasitarias	0/128	0/61	0/67	NT	0/11	0/117	NT

Nota: En negrita, los valores p considerados significativos en la univariante: p < 0.150. Abreviaturas: eLTC: expansiones de linfocitos T citotóxicos. NT: no realizado test estadístico por bajo o nulo número de eventos.

No encontramos diferencias en la incidencia de muertes relacionadas con la infección a lo largo del segundo y tercer año tras el alo-TPH en función de si se presentaba o no eLTC relativa (4% en ambos grupos, n= 3). La mediana de supervivencia relacionada con la infección fue de 133 y 145 meses (p=0,5) para los pacientes que desarrollaron o no una eLTC relativa.

Con una mediana de seguimiento de 42 meses (rango intercuartílico 22-75 meses), la mediana de SG de toda la cohorte todavía no ha sido alcanzada. No encontramos diferencias en cuanto a la SG en función de la presencia o ausencia de eLTC relativa, presentando una mediana de 115 frente a 143 meses respectivamente (p=0,4; HR=1,3; 95% IC, 0,6-2,7; **Figura 5.1 A**). La mediana de tiempo hasta la recaída tampoco ha sido alcanzada en ninguno de los grupos, que no parecen presentar distintos riesgos de recaída de la enfermedad de base (p=0.6; HR=0.8; 95% IC= 0.4-1.7; **Figura 5.1 B**).

Figura 5.1. Curvas Kaplan-Meier mostrando las diferencias en supervivencia global (A) y tiempo hasta la recaída (B), entre los pacientes en función de que presentaran una eLTC relativa.



eLTC absolutas.

Catorce pacientes en toda la cohorte desarrollaron un recuento de linfocitos T CD8+ por encima de $2 \times 10^9/L$ de manera persistente (durante más de 6 meses). Además, estos pacientes cumplían también criterios para su inclusión dentro de las eLTC relativas. Las características de estos 14 paciente las resumimos en las **Tablas 8.1 y 8.2**. La detección de una eLTC absoluta se asoció de una manera significativa con el desarrollo de EICR crónica (en 13 de 14 pacientes, $p=0,02$); esta asociación además se apoyaba en una mayor frecuencia de casos moderados y graves de EICRc ($p=0,03$). No observamos ningún caso de neutropenia, y en 7 de estos 14 pacientes encontramos un componente monoclonal en suero y/o positividad en el test de anticuerpos antinucleares. Se comunicaron dos manifestaciones caracterizadas como autoinmunes en este grupo de paciente con eLTC absolutas: un episodio de anemia hemolítica autoinmune (AHAI) y un paciente que experimentó polimiositis.

Tabla 8.1. Características demográficas, de la enfermedad de base y del procedimiento de TPH de los 14 pacientes que desarrollaron una eLTC absoluta.

	Edad	Género	Enfermedad de base	Estado de enfermedad al TPH	Régimen de acondicionamiento	DE	Identidad HLA	Fuente de PH	TBI	ATG
UPN18	61	F	LAM	2ªRC	IR	Sí	Sí	SP	No	No
UPN21	55	M	LP-T	1ªRC	IR	Sí	Sí	SP	No	No
UPN25	50	F	LAM	2ªRC	MA	No	Sí	SP	Sí	Sí
UPN43	41	M	LAM	2ªRC	MA	Sí	Sí	SP	Sí	No
UPN46	54	M	LAM	1ªRC	MA	Sí	Sí	SP	No	No
UPN55	66	M	LAM	Refractaria	IR	Sí	Sí	SP	No	No
UPN85	41	M	LAL	1ªRC	MA	No	Sí	MO	Sí	No
UPN92	47	M	SMD/SMP	1ªRC	IR	Sí	No	MO	No	No
UPN111	38	M	LAL	1ªRC	MA	No	Sí	SP	Sí	Sí
UPN113	35	M	LAM	1ªRC	IR	Sí	Sí	SP	No	No
UPN114	65	M	LAM	1ªRC	IR	Sí	Sí	SP	No	No
UPN125	37	M	LAM	1ªRC	MA	Sí	Sí	SP	Sí	No
UPN144	62	M	LAM	1ªRC	IR	Sí	Sí	SP	No	No
UPN145	43	F	SMD/SMP	RP	IR	No	Sí	MO	No	No

Abreviaturas: DE: Donante emparentado, F: femenino, Fuente PH.: fuente de progenitores hematopoyéticos, IR: Intensidad reducida, LAL: Leucemia aguda linfoblástica, LAM: Leucemia aguda mieloblástica, LP-T: Leucemia pre-T, M: masculino, MA: Mieloablato, MO: médula ósea, RC: Remisión completa, RP: Remisión parcial, SMD/smp: Síndrome mielodisplásico/ Síndrome mieloproliferativo, SP: Sangre periférica, TBI: irradiación corporal total, TPH: trasplante

Tabla 8.2. Eventos clínicos de los 14 pacientes que desarrollaron una eLTC absoluta.

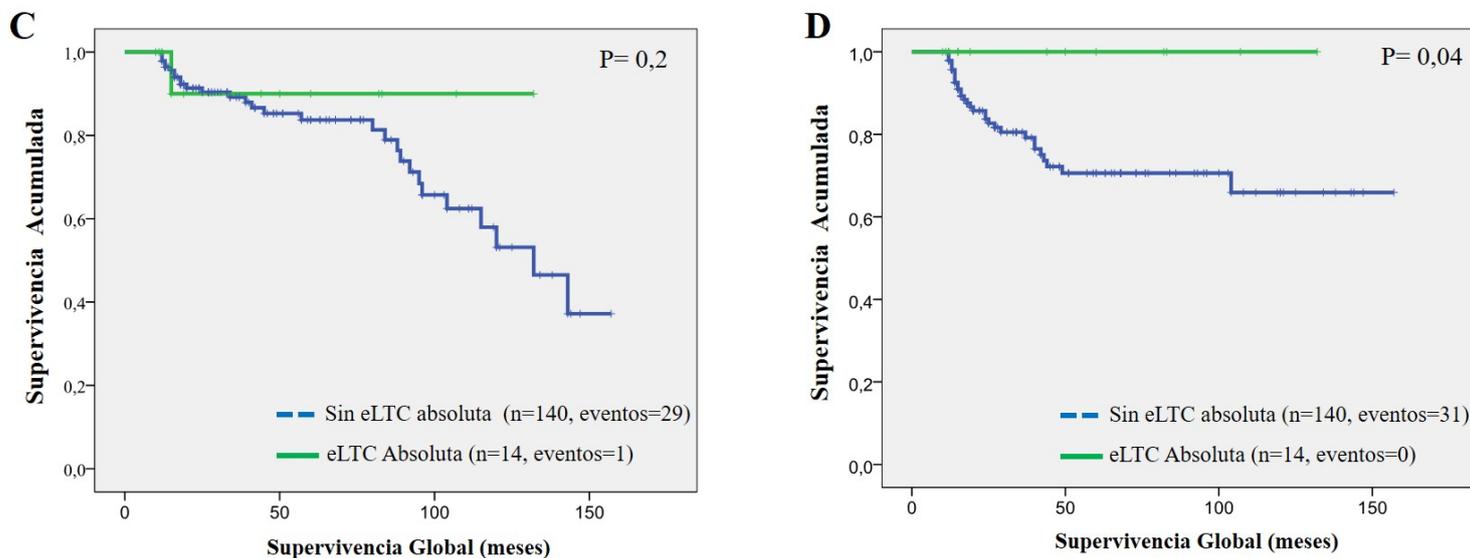
	EICRa (Glucksberg)	EICR (NIH)	Máxima linfocitosis alcanzada x 10 ⁹ /L	Reactivación CMV	Neutropenia	CM
UPN18	2	3	3,971	No	No	Sí
UPN21	No	3	3,963	No	No	No
UPN25	No	No	2,154	Sí	No	No
UPN43	No	3	2,198	No	No	No
UPN46	No	3	3,167	No	No	Sí
UPN55	1	3	2,329	Sí	No	Sí
UPN85	No	3	2,453	No	No	No
UPN92	1	1	2,183	Sí	No	No
UPN111	No	3	2,164	Sí	No	No
UPN113	No	3	2,254	No	No	No
UPN114	1	3	3,079	No	No	No
UPN125	3	3	2,561	Sí	No	No
UPN144	No	3	2,163	No	No	Sí
UPN145	No	3	2,455	No	No	No

Abreviaturas: CMV: citomegalovirus, EICRa: Enfermedad injerto contra receptor aguda, EICRc: Enfermedad injerto contra receptor crónica, CM: componente monoclonal

No encontramos ninguna diferencia cuando analizamos el número de eventos infecciosos relevantes en función del periodo de trasplante (**Tabla 7**). La incidencia de muertes relacionadas con la infección a lo largo del 2º y 3º años tras el trasplante fue de 1 y 5 casos dentro de los grupos con o sin eLTC absolutas ($p=0,7$) La mediana de supervivencia relacionada con la infección fue de 131 y 141 meses ($p=0,4$) en función de la presencia o no de este tipo de eLTC absolutas.

Debido al limitado número de pacientes con eLTC absolutas, el análisis de SG según método Cox no obtuvo significación estadística ($p=0,2$; HR= 1,3, 95% IC 0,6-2,7; **Figura 5.2 A**), a pesar de una mediana de supervivencia manifiestamente distinta de 132 meses en el grupo sin eLTC absoluta frente una mediana de tiempo no alcanzada en el grupo que presentó este tipo de expansiones persistentes. Ninguno de los 14 pacientes con una eLTC absoluta recayó mientras que 31 pacientes (22%) sin este tipo de expansiones lo hizo ($p=0,04$; HR = 5,2; 95% IC , 1,1-11,2; **Figura 5.2 B**).

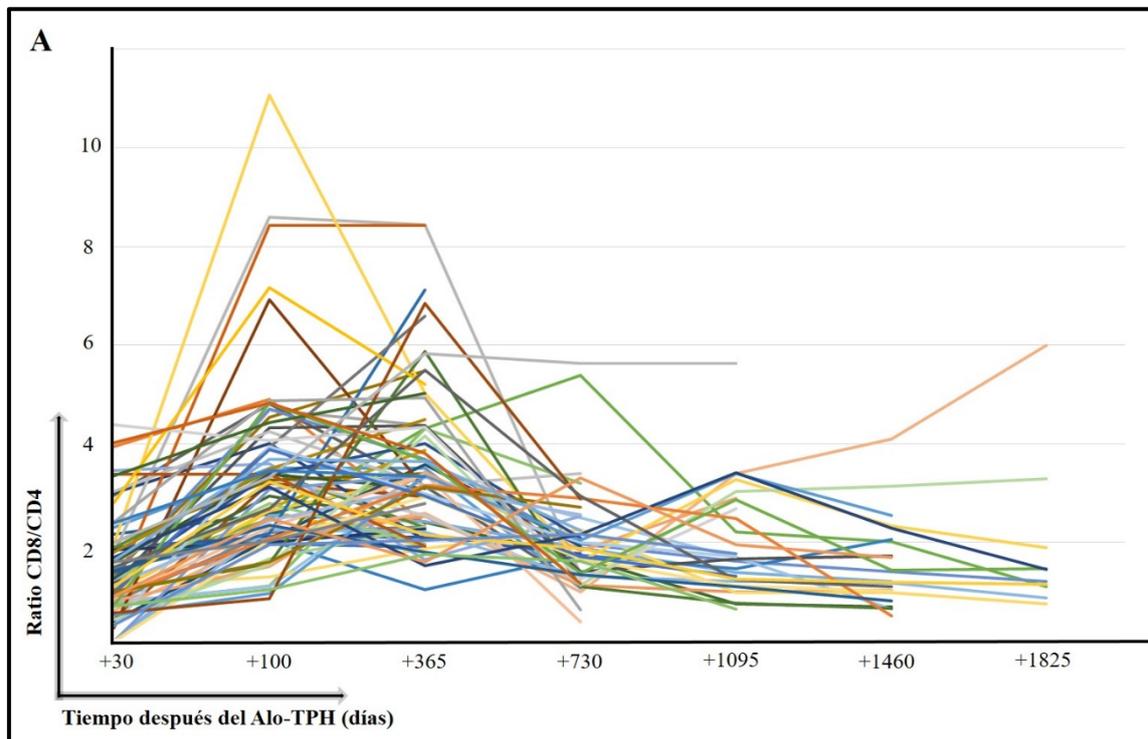
Figura 5.2. Curvas Kaplan-Meier mostrando las diferencias en supervivencia global (A) y tiempo hasta la recaída (B), entre los pacientes en función de que presentaran una eLTC absoluta.

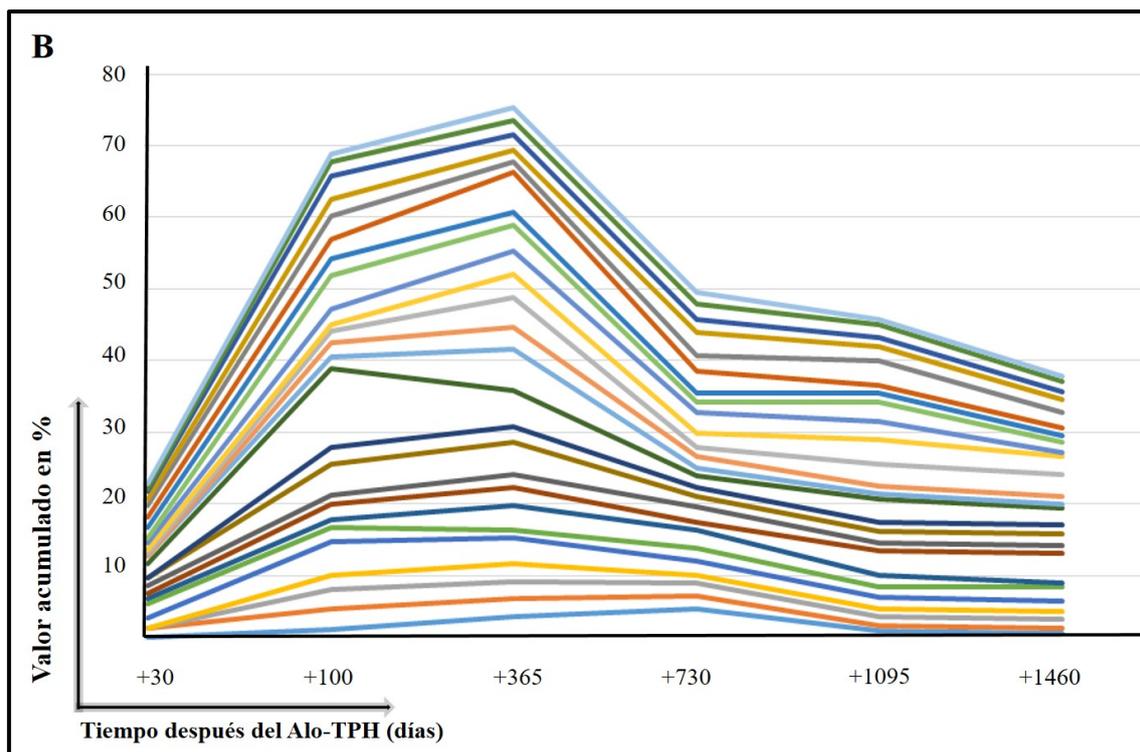


Dinámica longitudinal de las eLTC

En lo que respecta al seguimiento de estas expansiones de LTC la **Figura 5.3A** ilustra los valores de la ratio CD8+/CD4+ durante la evolución de los 75 pacientes que presentaron una eLTC relativa. Los valores de esta ratio mostraron una distribución normal en cada uno de los momentos considerados, mostrando en el día + 30 una media (+/- desviación estándar) de 1,5 +/- 0,9 en , 3,2 +/- 1,8 en el día +100, 3,5+/- 1,5 en el día +365, 3,1 +/- 1,8 en el día +730, 3,1+/- 1,5 en el día +1095, 2,6+/- 1,8, en el día +1440, 1,8+/- 1 en el día + 1825, con uno de los pacientes alcanzando el mayor máximo de la ratio (11) en el día +100.

Figura 5.3. Dinámica de las expansiones relativas. A) Representación lineal a lo largo del tiempo tras alo-TPH de la ratio CD8+/CD4+ en los 75 pacientes con eLTC relativa. B) Gráfico de valores acumulados de 25 pacientes con una eLTC relativa y un seguimiento mínimo de 1440 días desde el alo-TPH. Cada línea representa, en cada punto temporal, la suma del valor en porcentaje respecto al total de casos, de un nuevo caso a los reproducidos por debajo.



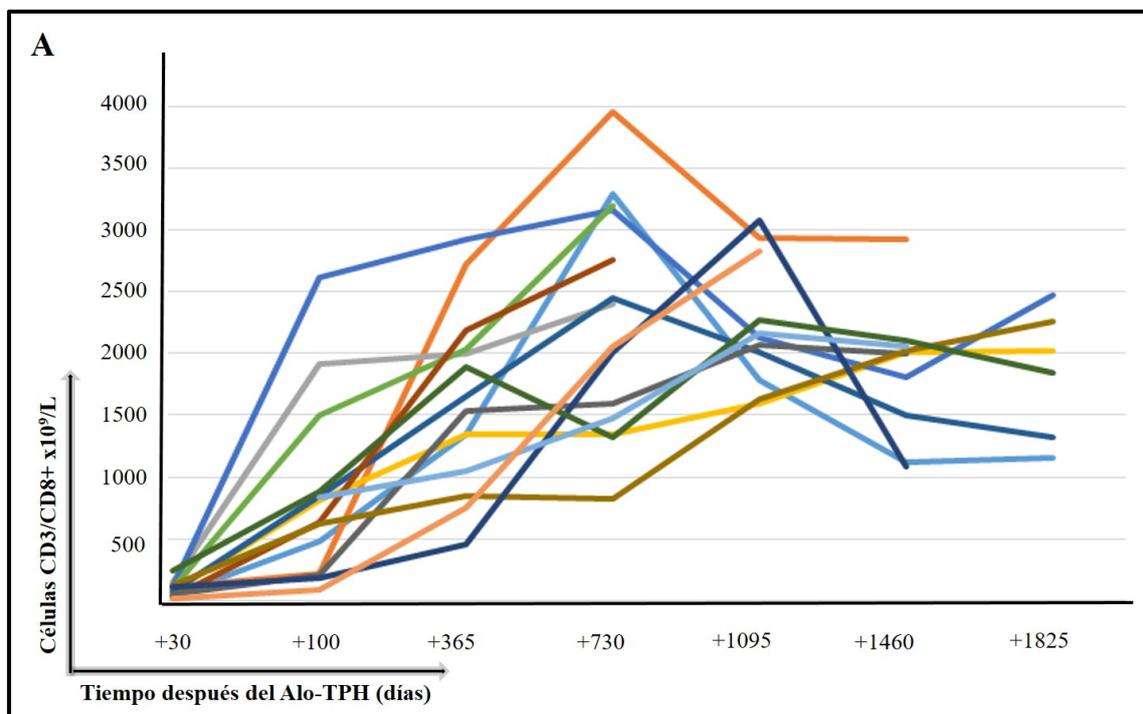


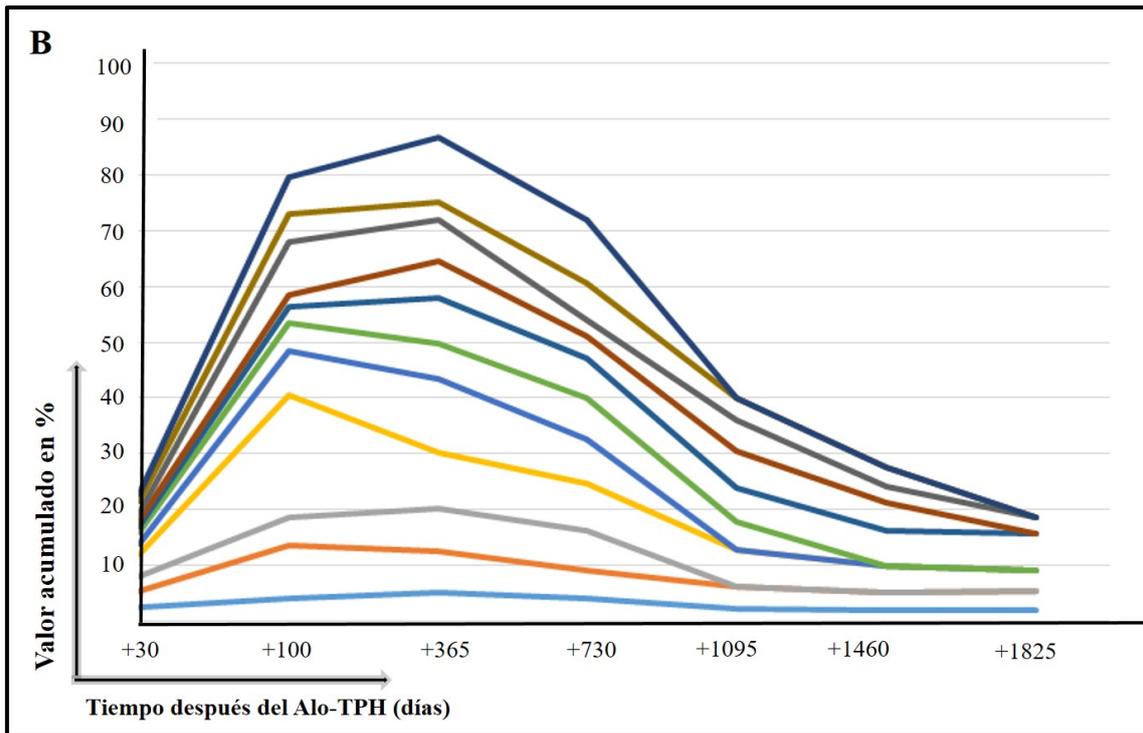
La **Figura 5.3 B** es un gráfico lineal de valores acumulados, con el objetivo de representar la tendencia a lo largo del tiempo de la ratio CD8+/CD4+; tendencia que incluye solo aquellos pacientes con una eLTC relativa y un seguimiento mínimo de 5 años. La línea inferior representa el porcentaje respecto al total de casos de la ratio CD8+/CD4+ de un paciente, acumulándose los casos inferiores en cada una de las líneas siguientes. De tal manera que la línea superior representa el porcentaje acumulado de los 25 casos con eLTC relativa y seguimiento prolongado, respecto al total de casos con eLTC. Este gráfico muestra de una manera clara la tendencia de la ratio a lo largo del tiempo. Existe una tendencia a su incremento en todos los pacientes entre los días + 30 y + 100, y en el 92 % de los casos esa tendencia ascendente se mantiene entre los días +100 y al año tras el trasplante. En ese momento, los pacientes muestran una transición hacia una tendencia decreciente de la ratio que se reduce de manera significativa en todos los casos entre los días + 365 y + 1095, momento en el que en la mayoría de los enfermos, se alcanza una meseta.

En la cohorte de pacientes con eLTC absolutas, el recuento de células CD8+ comenzaba a diferenciarse de manera significativa respecto de los pacientes sin eLTC absoluta en el día +100 ($0,750$ Vs. $0,492 \times 10^9/L$, $p=0,03$), y el comportamiento de la

ratio seguía una tendencia similar al descrito anteriormente en los casos de eLTC relativa (Figura 5.4 A y B).

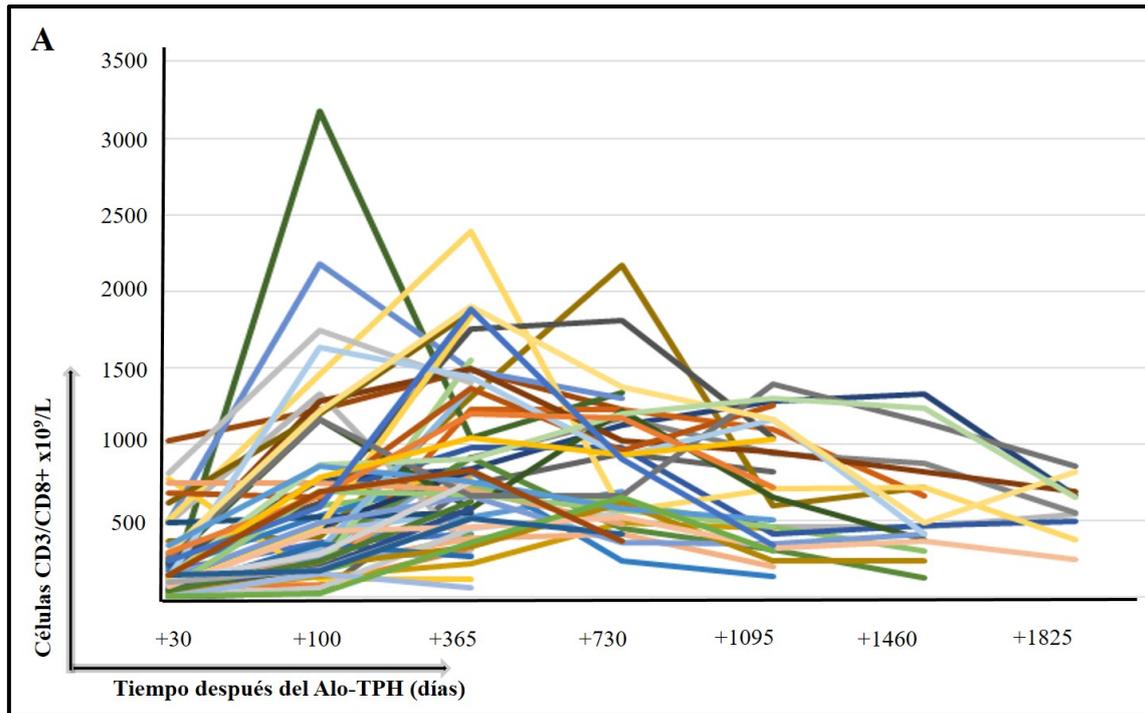
Figura 5.4. Dinámica de las expansiones absolutas. A) Representación lineal a lo largo del tiempo tras alo-TPH del recuento de linfocitos CD3+CD8+ en los 14 pacientes con eLTC absoluta. B) Gráfico línea de valores acumulados de 11 pacientes con una eLTC absoluta y un seguimiento mínimo de 1440 días desde el alo-TPH. Cada línea representa, en cada punto temporal, la suma del valor en porcentaje respecto al total de casos con eLTC, de un nuevo caso a los reproducidos por debajo.

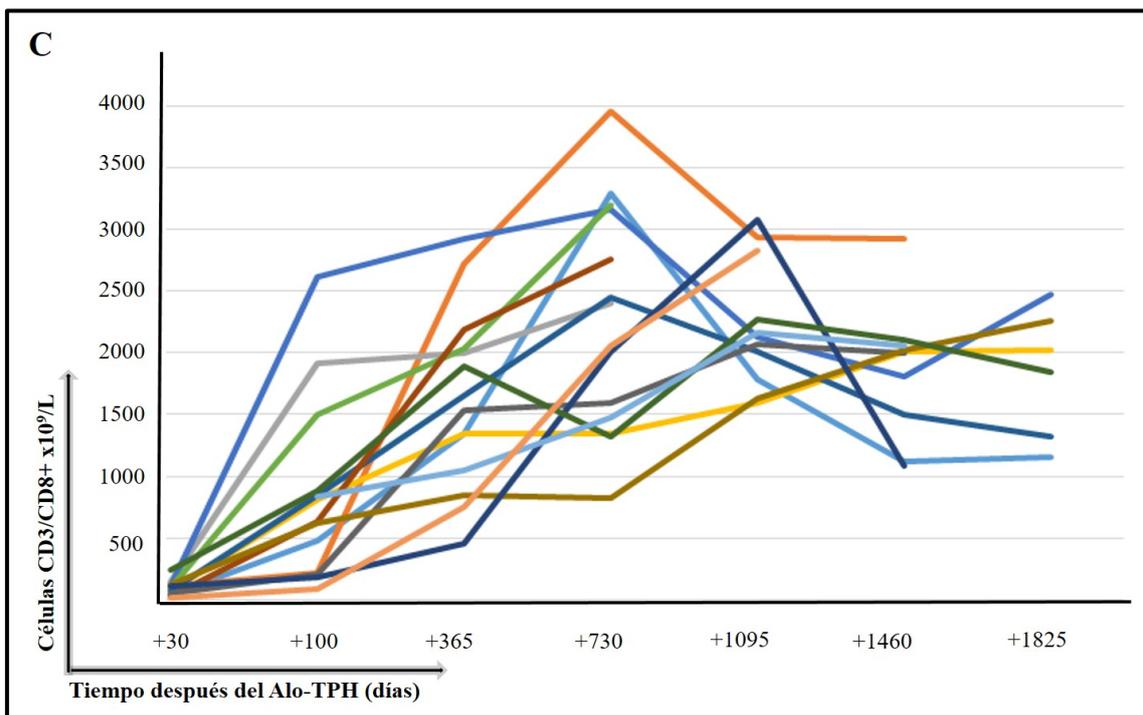
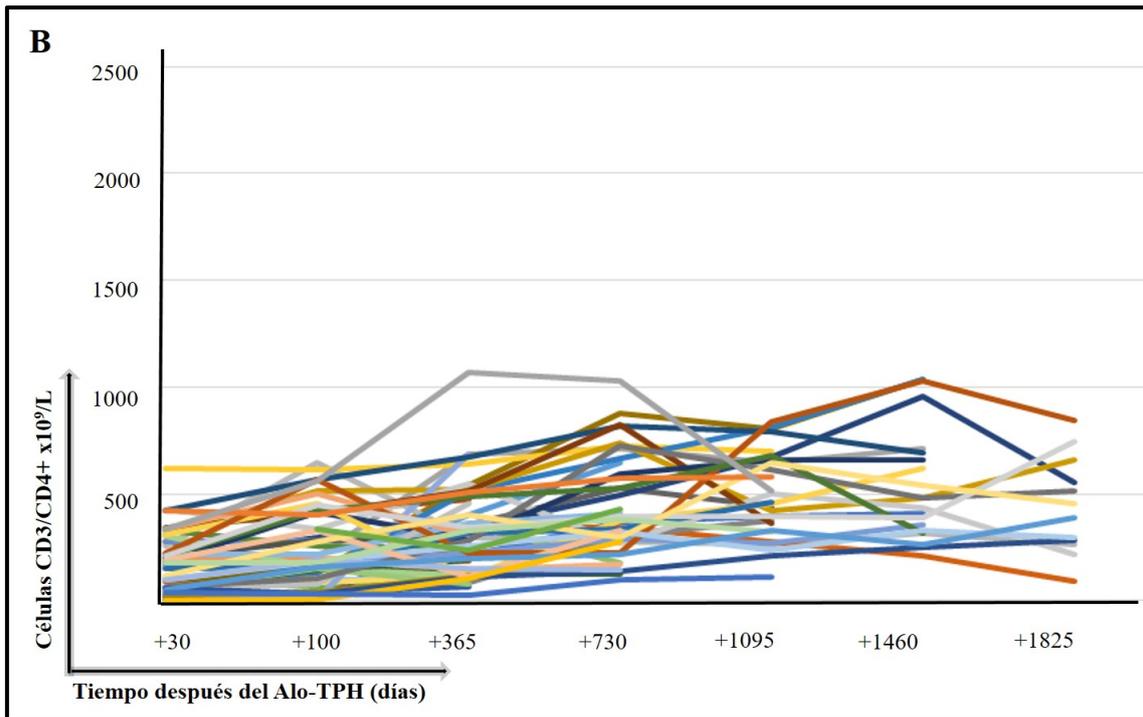


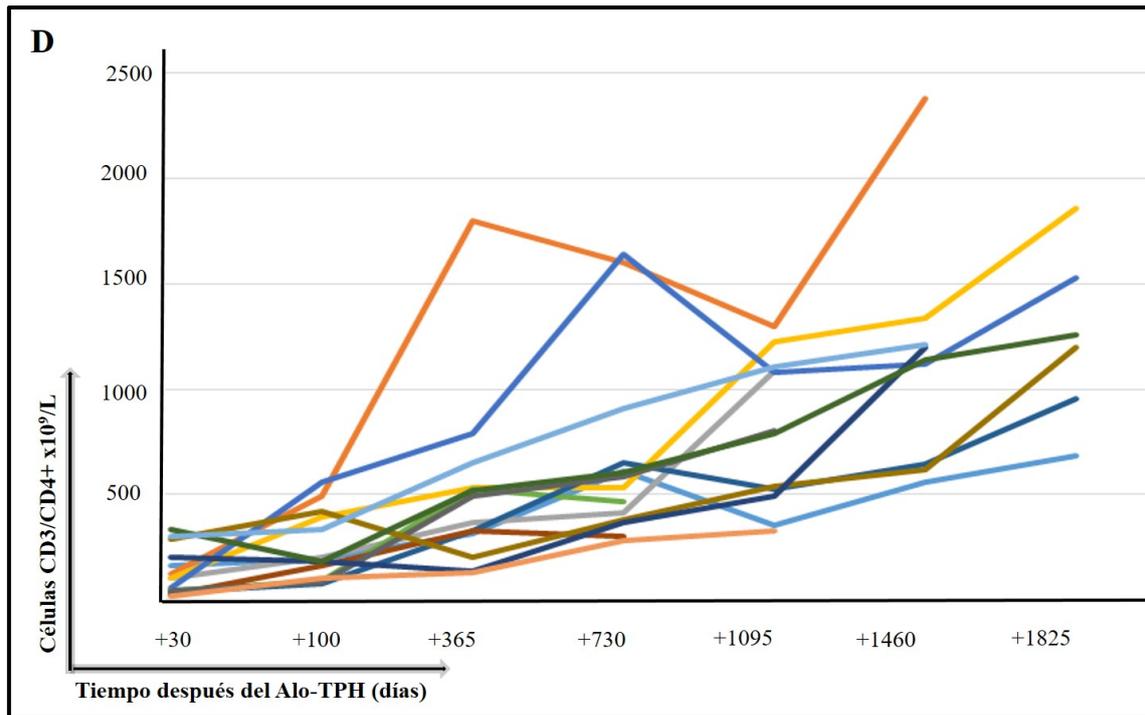


El incremento del recuento de células CD4+, comparado con el resto de poblaciones celulares, tras el día +1095, fue el responsable de que la ratio se normalizara en el largo plazo en el caso de las eLTC absolutas (**Figuras 5.5 A y B** para las eLTC relativas; **Figura 5.5 C y D** para las eLTC absolutas).

Figura 5.5. Dinámica del recuento de linfocitos CD8+ y CD4+. (A y B): representación lineal del recuento de linfocitos CD8+ (A) y CD4+ (B) en el grupo de eLTC relativas a lo largo del tiempo. (C y D): representación lineal del recuento de CD8+ (C) y CD4+ (D) en el grupo de eLTC absolutas. Nota: en los grupos A y B los 14 pacientes que cumplían criterios de eLTC absolutas fueron excluidos.







Características inmunofenotípicas y moleculares.

En 17 pacientes con eLTC pudimos analizar de manera transversal un panel inmunofenotípico extendido: 5 casos con eLTC absoluta y 12 casos con eLTC relativa (**Tabla 9**). La muestra a analizar fue elegida del punto temporal en el que la ratio o el recuento absoluto cumpliera nuestro criterio definitorio de eLTC. En todos los casos encontramos un fenotipo de célula CD8+ citotóxica expresando cadenas alfa/beta en el receptor de células T. Encontramos pequeñas diferencias en la expresión de CD25, CD16 y CD1a. Un paciente con una eLTC relativa mostró una expresión intensa del marcador CD56: su ratio se normalizó en el día +730 sin haber sufrido ningún evento de característica inmune.

Tabla 9. Características inmunofenotípicas ampliadas de 5 casos con eLTC absoluta y 12 casos de eLTC relativa.

eLTC	Paciente	CD3	CD8	CD4	CD7	1a	CD2	CD25	CD5	HLA-DR	$\alpha\beta$	$\gamma\delta$	CD56	CD57	CD16	TCR	STAT3
R	UPN2	+	+	-	+	-	+	±	+	+	+	-	-	+	-	Clonal	Neg
R	UPN23	+	+	-	+	±	+	+	+	+	+	-	-	+	-	Clonal	Neg
R	UPN24	+	+	-	+	±	+	+	+	+	+	-	-	+	-	Clonal	Neg
A	UPN25	+	+	-	+		+	+	+	+	+	-	-	+	+	Clonal	Neg
R	UPN27	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	Oligoclonal	Neg
R	UPN28	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	Oligoclonal	Neg
A	UPN46	+	+	-	+	±	+	-	+	+	+	-	-	+	-	Clonal	Neg
R	UPN66	+	+	-	+	-	+	±	+	+	+	-	-	+	±	Clonal	Neg
A	UPN92	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	Clonal	Neg
A	UPN114	+	+	-	+	±	+	±	+	+	+	-	-	+	-	Clonal	Neg
R	UPN122	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	Clonal	Neg
R	UPN126	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	Clonal	Neg
R	UPN128	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	Oligoclonal	Neg
R	UPN131	+	+	-	+	-	+	±	+	+	+	-	+	+	+	Clonal	Neg
R	UPN135	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	Clonal	Neg
R	UPN136	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	Polyclonal	Neg
A	UPN144	+	+	-	+	+	+	±	+	+	+	-	-	+	-	Clonal	Neg

Abreviaturas: A: Absolutas, e LTC: expansiones de linfocitos T citotóxicos, Neg: negativo, R: relativas

De los 75 pacientes con expansión de linfocitos T citotóxicos disponíamos de ADN en 68 casos (incluidos los 14 pacientes con eLTC absoluta). El ADN correspondía en todos los casos a una fecha en que la ratio y el contaje absoluto cumplían los criterios que establecimos para la definición de expansión persistente y, en los casos en los que fue posible, siempre elegimos la muestra que coincidiera con el pico más alto de la ratio o del recuento. Para incrementar la sensibilidad de la técnica de PCR, se seleccionó ADN de células inmuno-seleccionadas CD3+ en 54 de 68 casos. Además, todas estas muestras fueron estudiadas para la presencia del reordenamiento de TCR y para la presencia de mutaciones en el exón 21 del gen *STAT3*.

En el grupo de pacientes con eLTC relativa, el estado de reordenamiento del gen TCR fue descrito como clonal, oligoclonal o policlonal en el 77%, 16% y 7% de los casos, respectivamente. El reordenamiento del gen TCR fue descrito como clonal en todos los casos de expansiones absolutas LTC (n= 14). No encontramos mutaciones somáticas en el exón 21 del gen *STAT 3* en ninguno de los casos relativos o absolutos de eLTC.

3.4. Discusión

Las expansiones periféricas independientes de la generación en el timo de células CD8+, derivadas a partir del inóculo en la fase inicial de la recuperación inmune tras alo-TPH es un fenómeno fisiológico bien estudiado. Sin embargo, la descripción de casos con LLGG sintomáticas y con comportamiento agresivo en el periodo post-alo-TPH ha generado cierta incertidumbre en cuanto a la naturaleza fisiológica de estas expansiones, sobre todo en los casos en los que la eLTC persiste más allá del periodo temprano post-alo-TPH. En nuestro estudio, el 28% y el 9% de los pacientes sometidos a alo-TPH mantuvieron una expansión relativa o absoluta más allá de los 2 años post-alo-TPH. Tanto el contexto clínico como la elevada proporción de casos sugieren que se trate de expansiones fisiológicas; un fenómeno benigno que en nuestro trabajo quedó confirmado por la ausencia de mutaciones en el exón 21 del gen *STAT3* y por la corrección a largo plazo del desequilibrio en la ratio CD8+/CD4+. Este trabajo, clínico, molecular e inmunofenotípico indica que la presencia de una “verdadera” LLGG T en el periodo post-alo-TPH es excepcional.

En la literatura se han descrito porcentajes muy distintos de pacientes afectados por este tipo de expansiones tras trasplante de órgano sólido o de progenitores hematopoyéticos. Estas diferencias son atribuibles, en parte, al uso de diversas definiciones y a la incorporación de nuevas técnicas moleculares e inmunofenotípicas en el seguimiento de los pacientes post-alo-TPH.^{38,39,218} La LLGG quedó definida por un incremento persistente en el porcentaje de LGG en una extensión de SP, normalmente con una cifra de linfocitos entre 2 y $20 \times 10^9/L$ sin otra causa identificable.²²⁸ Sin embargo, hoy en día se reconoce que incluso recuentos linfocitarios dentro de la normalidad pueden ser compatibles con el diagnóstico de LLGG.²²⁹ En nuestro estudio, intentando aplicar de manera estricta las definiciones de LLGG de la OMS, tuvimos en consideración dos definiciones distintas de eLTC. Por un lado una expansión cuantitativa absoluta ($> 2,0 \times 10^9/L$), y por otro lado una expansión relativa en forma de ratio $CD8+/CD4+ > 1,5$. En ambos casos exigimos que la expansión así definida, persistiera por más de 6 meses. En nuestra cohorte, no usar un umbral cuantitativo absoluto para definir una expansión linfocitaria supondría establecer el diagnóstico de expansión persistente en el 49% de los pacientes trasplantados. Con una caracterización inmunofenotípica o molecular adicional (como la presencia de un marcador NK o de un reordenamiento monoclonal) no conseguiríamos reducir ese porcentaje tan elevado de manera significativa: CD 57 se expresó en todos los casos con eLTC y en un 80% de estos casos el estudio molecular del receptor TCR mostraba un patrón neoplásico. Las mutaciones adquiridas en *STAT3*, responsables de la persistencia de clones de linfocitos T citotóxicos, son un fenómeno frecuente en la LLGG, y ese tipo de clones mutados también se han indentificado en determinadas enfermedades con base autoinmune como la aplasia medular y el síndrome mielodisplásico hipocelular.^{221,230} Nuestro estudio descarta la presencia de mutaciones adquiridas en el exón 21 de *STAT3* en las células responsables de esas expansiones persistentes de LTC durante el seguimiento de pacientes sometidos a alo-TPH.

El enfoque traslacional de nuestro trabajo incluyó la evaluación del impacto clínico de estas eLTC. Encontramos que la presencia de expansiones relativas fue más frecuente en aquellos pacientes que reactivaron CMV y/o desarrollaron EICR aguda así como en aquellos casos que fueron sometidos a un acondicionamiento de IR o recibieron ATG como parte de la profilaxis frente a EICR. El uso de ATG fue la variable que presentó una mayor asociación con el desarrollo de expansiones de LTC lo que concuerda con los

hallazgos recientemente comunicados que correlacionan el uso de ATG con la proliferación de un mayor número de células T de memoria CD8+, fundamentalmente debida al descenso de linfocitos T CD8+ inmaduros provocados por el uso de este agente.²²⁶

Nos parece destacable, al considerar solo los casos con expansión absoluta, que la persistencia de estos linfocitos CD8+ efectores se asoció en nuestro estudio a EICR crónica, en la mayor parte de los casos cuando esta era de grado severo. Podríamos hipotetizar que el incremento de la ratio CD8+/CD4+ en el post-alo-TPH es desencadenado por estos eventos del periodo temprano post-alo-TPH, alcanzando una verdadera linfocitosis T absoluta en el contexto de EICR crónica grave. La dinámica de estas expansiones, tanto las de naturaleza relativa como absoluta parecen seguir un patrón similar en todos los casos, con una reducción de la ratio CD8+/CD4+ que se inicia a partir del año post-alo-TPH. En el caso de las expansiones absolutas, la normalización de esa ratio a largo plazo se produjo en todos los casos por un incremento proporcional de los linfocitos CD4+, sin que se produjera un descenso significativo de los CD8+. Esta “expansión tardía compensatoria” de los linfocitos T CD4+ es otro argumento que apoya la naturaleza fisiológica, en contraposición a una naturaleza clonal maligna, de los casos con expansiones absolutas.

El desarrollo y mantenimiento de un repertorio de células T amplio es un requisito fundamental para la competencia del sistema inmune. En el periodo temprano tras el trasplante alogénico de PH el repertorio de células T procede de lo aportado en el inóculo del donante.^{231,232} Por esta razón, quisimos explorar si la distorsión en la amplitud del repertorio de células T provocado por la proliferación de estas expansiones (clonales u oligoclonales) tenía repercusiones a nivel clínico en forma de infecciones. Encontramos un mayor número de infecciones fúngicas y episodios de reactivación de CMV en el periodo temprano tras el trasplante alogénico de PH en el grupo de pacientes que presentaba una expansión relativa de LTC. En relación a esto, la estimulación crónica por antígenos de CMV ha sido postulado como un desencadenante potencial de las eLTC, ya que la asociación significativa de estas expansiones y la reactivación de CMV es un hallazgo comunicado de manera recurrente.^{38,47} Será necesario diseñar estudios con un seguimiento más estrecho de la reconstitución inmune para determinar de manera definitiva si el desarrollo de estas expansiones de LTC están precedidas de manera constante por estos eventos infecciosos del periodo temprano del alo-TPH. Las ILD han

mostrado, tanto en estudios básicos como clínicos, que los linfocitos T maduros procedentes del donante constituyen un componente crucial en el tratamiento de las recaídas que acontecen tras el alo-TPH.^{233,234,235} Además, la presencia de una proliferación de LTC ha sido relacionada con el efecto antitumoral en pacientes con leucemia linfática crónica (LLC) tras alo-TPH.²³⁶

Por todo ello, quisimos explorar si la presencia de este tipo de expansiones en esta cohorte se relacionaba con diferencias significativas en cuanto a supervivencia global o tiempo hasta la recaída. Sorprendentemente, ninguno de los 14 pacientes en los que identificamos una expansión absoluta de LTC experimentó una recaída de la enfermedad de base. Por un lado, esta asociación se sustenta en que encontramos estas expansiones absolutas en pacientes en su mayoría con EICR crónica severa, que es un mecanismo fundamental en el efecto anti cancerígeno del trasplante alogénico.^{38,237} Por otro lado, el espectro tan amplio de enfermedades de base incluido en nuestra cohorte nos obliga a interpretar esta asociación entre expansiones absolutas y supervivencia libre de enfermedad con cautela. Ya que estos pacientes con expansión absoluta y libres de recaída presentaban niveles elevados de linfocitos T CD8+ ya en el día +100, la enumeración de esta subpoblación y el análisis de su potencial valor predictivo del desarrollo de EICR crónica severa surge como un análisis derivado de nuestro trabajo a realizar en el futuro.

La principal limitación de nuestro estudio es la heterogeneidad, ya citada, en cuanto a la enfermedad de base por la que se realizó el trasplante alogénico de PH, lo que inevitablemente sesga los análisis de supervivencia. Además, el escaso número de pacientes que cumplían los requisitos para ser diagnosticados de una expansión absoluta de LTC podría provocar la infraestimación de algunas asociaciones; estas dos limitaciones subrayan la importancia de los estudios colaborativos multicéntricos.

En resumen, la aparición de una eLTC persistente es un evento frecuente tras alo-TPH, asociado a determinadas variables tanto del procedimiento como del seguimiento. La ausencia de mutaciones adquiridas en *STAT3* y la corrección a largo plazo de estas expansiones apoya su naturaleza benigna lo que se manifiesta clínicamente en la ausencia de impacto negativo tanto en el pronóstico como en la incidencia de eventos infecciosos.

3.5. Conclusiones

- La aparición de una eLTC persistente es un evento frecuente tras alo-TPH, con una incidencia aproximada de un 50% de los casos, siendo más común en los enfermos que recibieron acondicionamiento de IR.
- Los pacientes que presentaron una eLTC persistente presentaron una mayor frecuencia de reactivación de CMV y de EICR aguda. Esta asociación mantuvo la significación al ajustar por el tipo de acondicionamiento.
- La mayoría de los pacientes mostraron esta expansión en el día +100, alcanzando su pico cuantitativo al año tras el procedimiento, cuando comenzó una tendencia a la normalización, que se alcanzó en todos los casos al tercer año post-alo-TPH.
- La ausencia de mutaciones adquiridas en *STAT3* apoya la naturaleza benigna de estas expansiones, que viene expresada en la clínica por un nulo impacto de estas expansiones en el pronóstico.
- Ninguno de los pacientes en los que identificamos una eLTC absoluta experimentó una recaída de la enfermedad de base. Esto probablemente es debido a que la presencia de estas expansiones se encuentra relacionada con la EICR crónica severa, que es un mecanismo fundamental en el efecto anti cancerígeno del alo-TPH. Ya que estos pacientes con expansión absoluta y libres de recaída presentaban niveles elevados de linfocitos T CD8+ ya en el día +100, la enumeración de esta subpoblación y el análisis de su potencial valor predictivo del desarrollo de EICR crónica severa surge como un análisis derivado de nuestro trabajo a realizar en el futuro.

CAPÍTULO II:

“Valor pronóstico del compartimento *natural killer* CD56^{bright} en el inóculo infundido en el desarrollo de enfermedad injerto contra receptor crónica tras trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos”

4. CAPÍTULO II: “Valor pronóstico del compartimento *natural killer* CD56^{bright} en el inóculo infundido en el desarrollo de enfermedad injerto contra receptor crónica tras trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos”

4.1. Introducción.

El éxito de los alo-TPH de PHSP se ve limitado por una tasa mayor de desarrollo de EICR crónica,²³⁸ atribuida a la infusión de un mayor número de linfocitos T.²³⁹ Otros trabajos han sugerido como responsables de la EICR crónica a la cantidad de progenitores CD34+ del donante infundidos,²⁴⁰ a la población de linfocitos T activados en etapa tardía,²⁴¹ o a la cantidad de células nucleadas totales infundidas.²⁴² Por otro lado, las poblaciones inmunes asociadas a una mayor tasa de EICR aguda en alo-TPH de SP incluye a células dendríticas y T reguladoras, sin que, en estos estudios, se haya encontrado una asociación de dichas poblaciones con la forma crónica.^{243,244}

Recientemente, Kariminia y colaboradores han revisado los datos del estudio clínico CBMTG 0601, para intentar arrojar luz sobre este tema. En dicho estudio se comparaba el uso de PH de MO frente a aquellos obtenidos de SP. En ambos casos se administraba al donante la misma dosis de G-CSF, realizándose la colecta según el mismo esquema temporal. Además, la población de estudio eran todos receptores adultos (por encima de 16 años de edad) con DE (HLA 8/8 o 7/8). La aleatorización permitía eliminar los sesgos en cuanto a otros factores de confusión potenciales, como el régimen de acondicionamiento o la enfermedad de base.²⁴⁵ A partir de los datos de ese ensayo, los autores determinaron una serie de poblaciones inmunes en los productos de donación procedentes tanto de MO como de SP, en ambos casos estimulados con G-CSF. Inicialmente, encontraron asociaciones significativas entre dos poblaciones inmunes y el desarrollo de EICR crónica y de su forma extensa. Tanto la población de linfocitos T CD4+ IFN gamma+ como la de células NK reguladoras CD56^{bright} presentaron una relación inversa y significativa con el desarrollo de EICR crónica, sugiriendo su papel regulador del proceso.

Posteriormente, pusieron en contexto con el resto de las poblaciones inmunes estos hallazgos y encontraron que: i) no existía ninguna otra correlación significativa entre otras poblaciones y eventos clínicos, pero sí añadían dos asociaciones significativas, la relación

inversa entre la cantidad infundida de CD56^{bright} NK y el desarrollo de EICR aguda, y la de la cantidad de células T CD4+ IFN gamma+ con la mortalidad relacionada con el trasplante; ii) estas asociaciones se mantuvieron tras realizar un análisis secundario que incluyera a aquellos pacientes que murieron o recayeron antes de dos años post-trasplante; y iii) la inclusión de ambos tipos de inóculos (tanto MO como SP) incrementaba la asociación de estas poblaciones con el desarrollo de EICR crónica, pero al medir el impacto de manera separada, la población CD56^{bright} NK presentaba un mayor impacto en el subgrupo de pacientes en el que los progenitores habían sido recogidos de SP.

En este estudio hemos querido validar con nuestra cohorte de pacientes, el papel que juega la cantidad de células CD56^{bright} infundidas en el desarrollo de la EICR.

4.2. Pacientes, material y métodos

Pacientes

Se incluyeron pacientes que, de manera consecutiva, fueron sometidos a un alo-TPH de sangre periférica dentro del programa de trasplante alogénico del servicio de Hematología y Oncología Médica del hospital Universitario Morales Meseguer entre los años 2003 y 2017, que además cumplieron los siguientes criterios:

- i) Que tuvieran una determinación cuantitativa de las subpoblaciones linfocitarias mediante CMF multiparamétrica en el inóculo donado.
- ii) Que el esquema de movilización del donante incluyera G-CSF.
- iii) Que el inóculo no fuera manipulado en su composición.
- iv) Pacientes con muertes o recaídas tempranas, antes del día +100 o que experimentaron fallo de injerto primario o secundario fueron excluidos en un primer análisis.

Se estudiaron dos cohortes de pacientes: intentando reflejar los criterios de inclusión del trabajo pivotal de Karimnia y colaboradores. En la primera cohorte se excluyeron aquellos pacientes con alo-TPH de DNE, de donante haploidéntico y aquellos pacientes con muertes o recaídas tempranas, antes del día +100. Esta cohorte seleccionada estaba compuesta por 104 pacientes. En un segundo análisis, se consideró el total de 207 pacientes incluidos inicialmente. Los pacientes que recibieron ILD y que cumplían todos los criterios

anteriormente citados, fueron censurados en la fecha de ILD. Se obtuvo consentimiento informado para el acceso a los datos clínicos de acuerdo a protocolos acordados por el Comité de Ética de Investigación Clínica del hospital Universitario Morales Meseguer y a la declaración de Helsinki.

Proceso de aféresis

Se realizó un hemograma y recuento de células CD34+ en sangre periférica a partir del día 4 de movilización. El procedimiento de leucoaféresis se inició si la concentración de CD34+ superaba los 15/uL. Los dispositivos que se emplearon para la colecta de células mononucleares fueron el separador celular Cobe Spectra (Terumo BCT®) con el programa de CMN (linfocitoaféresis) y el separador Spectra Optia (Terumo BCT®), procesándose la volemia estimada para que el rango de CD34+ por kilogramo de peso del receptor solicitado se alcanzara (generalmente $4-8 \times 10^6/\text{Kg}$).

Estudios de citometría de flujo

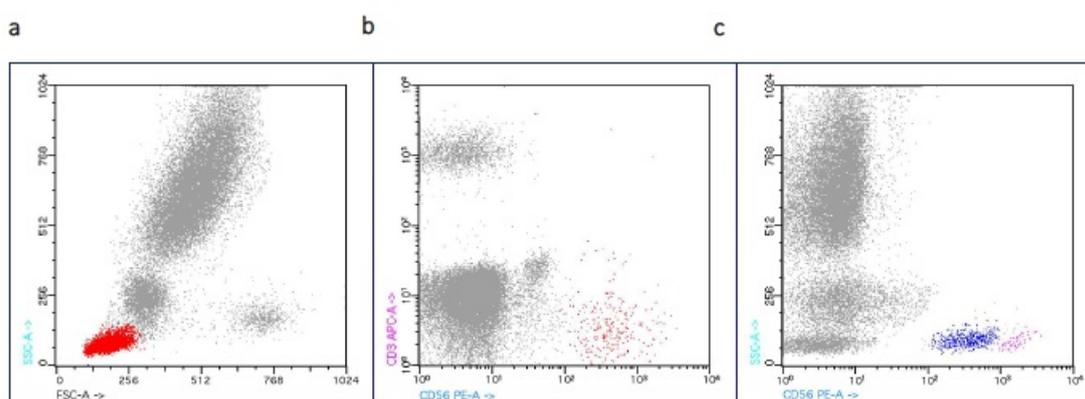
Las muestras para la determinación mediante CMF de las poblaciones linfocitarias se obtuvieron de alícuotas del inóculo, tras completar el proceso de recolección. Las muestras se marcaron con las siguientes combinaciones de fluorocromo-anticuerpo: FITC-anti-CD3, PE-anti-CD4, y PerCP-anti-CD19 FITC, y una segunda combinación con anti-CD3, PE-anti-CD56, y PerCP-anti-CD8. Todos los anticuerpos fueron adquiridos de Becton-Dickinson, usándose controles isotipo en cada experimento.

Las poblaciones CD3+, CD3+/CD8+, CD3+/CD4+, CD3-/CD56+ y CD19+ fueron identificadas según estrategias de selección descritas previamente.²⁴⁶ En lo que respecta a la población NK CD56^{bright} (**Figura 6**), se identificó en un primer paso la población linfocitaria por su baja intensidad en la gráfica que enfrenta la dispersión angular y frontal de luz. Las células *natural killer* se determinaron mediante selección de población linfocitaria que fuera negativa para CD3 y positiva para CD56. Los compartimentos de células NK CD56^{bright} y CD56^{dim} fueron discriminados en función de su densidad de fluorescencia. El compartimento CD56^{bright} presentó una intensidad media de fluorescencia (IMF) de 836 (rango, 550-1000) frente al compartimento CD56^{dim}, que mostraba una IMF de 238 (rango, 130-450).

Se utilizó un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) para la adquisición de, al menos, 20.000 eventos en cada experimento y el análisis se realizó mediante el uso del

programa *Paint-a-Gate* y *CellQuest* (Becton Dickinson) para la obtención de los porcentajes e IMF de células que cumplieran los criterios de selección.

Figura 6. Estrategia de selección *gating*, en la determinación de porcentaje e intensidad de fluorescencia media de los compartimentos *bright* y *dim* dentro de los linfocitos NK. a) Inicialmente, seleccionamos la población (en rojo) de menor intensidad en ambos ejes de la gráfica que enfrenta la dispersión lumínica angular y frontal. b) En segundo lugar, dentro la población que hemos seleccionado en el paso a, seleccionamos aquellos elementos CD3-/CD56+. c) El último paso consiste en dividir la población que haya satisfecho las condiciones previas en función de la intensidad de expresión de CD56, en un *cluster* brillante (*bright*-violeta en la gráfica) y otro de intensidad intermedia (*dim*-azul en la gráfica).



Estadística

Las variables categóricas se presentan mediante proporciones y las variables continuas mediante media \pm desviación estándar o mediante mediana (rango intercuartílico), en función del método más representativo según la variable expresada. Se empleó el test de Kolmogorov-Smirnov para verificar la distribución normal de las variables continuas.

Para correlacionar las variables con los eventos clínicos evaluados hemos realizado un análisis univariante mediante modelo de regresión de Cox. Posteriormente hemos realizado un análisis multivariante incluyendo las variables que alcanzaron una $p < 0,150$ en el análisis univariante.

Para la dicotomización de las variables continuas determinamos los valores de área bajo la curva, especificidad y sensibilidad utilizando la *Receiver Operator curve* (ROC) de cada una de ellas. Se eligió el punto de corte en función de los valores de área bajo la curva (AUC). Si el AUC era >600 ó <400 , se optó por el valor de la variable con mayor especificidad y sensibilidad; si el valor de AUC ROC se encontraba entre los valores de 600 y 400, se optó por dicotomizar en función del valor de percentil 75.

El análisis se realizó mediante SPSS 21. 0 (SPSS, Inc; Chicago, Illinois, EEUU).

4.3. Resultados

Estudio Descriptivo: Características clínicas de la cohorte

En la **tabla 10** se resume los principales datos de caracterización de los pacientes de nuestra cohorte, incluyendo datos sobre la enfermedad de base, demográficos (edad al trasplante) y las variables clínicas y biológicas del procedimiento, consideradas relevantes para el estudio.

Mostramos los datos correspondientes a la cohorte inicialmente seleccionada, que refleja los mismos criterios de inclusión que el trabajo de Kariminia,²¹² y los de la cohorte incluida en un segundo análisis. Las diferencias significativas entre ambas cohortes reflejan, fundamentalmente, los criterios de exclusión para la primera cohorte: pacientes con alo-TPH no emparentado y haploidéntico, y la exclusión de los pacientes que, por fallecimiento o recaída, no alcanzaron la fecha para el diagnóstico de EICR crónica (día +100), hecho que, de manera indirecta, supone un sesgo de exclusión de los casos con peor pronóstico tras alo-TPH.

En la cohorte inicialmente seleccionada de 104 pacientes, obtuvimos una mediana de edad de 47 años (33-57 años) al alo-TPH, encontrando un muy discreto predominio del sexo masculino (51%) en el caso del receptor. La enfermedad de base al diagnóstico mostraba un 47% de pacientes diagnosticados de leucemia aguda mieloide/síndrome mielodisplásico frente a un 53% con otras enfermedades.

Destacamos la presencia de un 26% de disparidad entre receptor y donante en cuanto a la seropositividad para CMV y el equilibrio en los porcentajes entre regímenes de acondicionamiento mieloablatoivo y de intensidad reducida (52% y 48%, respectivamente).

En la **tabla 11** se puede observar que las células NK representaban el menor porcentaje dentro de las poblaciones linfocitarias y cómo, dentro de éstas, el compartimento *bright*, representaba sólo un 0,5%.

Tabla 10. Principales características al trasplante de los pacientes incluidos en el estudio.

	Cohorte Total (n=207)	Cohorte Seleccionada (n=104)
Edad (años), mediana (p25-p75)		
Receptor	46 (31 – 57)	47 (33 - 57)
Donante	42 (27 – 53)	45 (33 - 57)
Varón/Mujer, n(%)		
Receptor	115 (55,6) / 92 (44,4)	53(51) / 51(49)
Donante	118 (57,1) / 88 (42,9)	51(49) / 53(51)
Disparidad Género, n(%)	99 (47,8)	51 (49,0)
Donante mujer / Receptor varón	53 (25,6)	30 (29,1)
Peso(Kg), mediana (p25-p75)		
Receptor	71 (60 -81,5)	69,2 (60 – 80)
Donante	72 (62 -84,9)	69 (59 – 80,2)
Seropositividad a CMV, n (%)		
Receptor	167 (80,7)	84 (81,6)
Donante	143 (69,1)	80 (78,4)
Disparidad Receptor/Donante	61 (29,5)	26 (26,5)
Diagnóstico enfermedad de base, n (%)		
SMD/LAM	95 (45,9)	49 (47,1)
Otras	112 (54,1)	55 (52,9)
RC al Alo-TPH, n (%)	127 (61,4)	32 (30,8)
TPH previo, n (%)		
Autólogo	33 (15,9)	2 (1,9)
Alogénico	10 (4,8)	19 (18,3)
Donante, n (%)		
Emparentado	166 (80,2)	
No emparentado	41 (19,8)	
HLA, n (%)		
Idéntico	153 (73,9)	99 (95,2)
Parcialmente idéntico	20 (9,7)	5 (4,8)
Haploidéntico	34 (16,4)	---
Fuente de progenitores, n (%)		
Sangre periférica	187 (90,3)	
Médula ósea	20 (9,7)	
Régimen de acondicionamiento, n (%)		
Mieloablativo	99 (47,8)	54 (51,9)
Intensidad Reducida	108 (52,2)	50 (48,1)
Irradiación en acondicionamiento , n (%)	51 (24,6)	24 (23,1)
ATG, n(%)	39 (18,8)	2 (1,9)
Profilaxis EICR, n (%)		
CyA /MTX	134 (64,7)	98 (94,2)
Otros	73 (35,3)	6 (5,8)

Abreviaturas: Alo-TPH: trasplante alogénico, ATG: timoglobulina, CMV: citomegalovirus, CyA: ciclosporina A, EICR: enfermedad injerto contra receptor, LAM: leucemia aguda mieloide, MTX: metotrexate. RC: remisión completa, SMD: síndrome mielodisplásico.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las dos cohortes analizadas y las poblaciones de linfocitos del inóculo (**Tabla 11**). La mediana (rango intercuartílico) del porcentaje de células NK CD56^{bright} que se obtuvo en el análisis por citometría de flujo del inóculo donado fue de 0,5% (0,3 -0,7) en la cohorte total y de 0,4% (0,3 – 0,6) en la seleccionada para el primer análisis.

Tabla 11. Distribución celular en el inóculo. Los porcentajes de los distintos compartimentos inmunes se calculan respecto del total de linfocitos.

Compartimento celular	Cohorte Total (n=207)	Cohorte Seleccionada (n=104)
Células nucleadas x10⁸/Kg, mediana (RIQ)	8,5 (5,4 – 11,5)	10,1 (7,4 – 12,9)
CD34+ x10⁶/Kg, mediana (RIQ)	5,1 (3,8 – 6,4)	5,2 (4,2 – 6,3)
Compartimentos inmunes, porcentaje respecto al total de linfocitos, mediana (RIQ)	Cohorte Total (n=207)	Cohorte Seleccionada (n=104)
CD3+/CD4+	43,8 (37,9 -48,5)	45,5 (41,1 – 50,3)
CD3+/CD8+	25,2 (20,4 – 31,0)	24,9 (19,9 – 31,3)
CD3-/CD56^{bright}	0,5 (0,3 -0,7)	0,4 (0,3 – 0,6)
CD3-/CD56^{dim}	7,1 (5,0 – 9,7)	6,8 (5,3 – 9,4)
CD19+	16,2 (12,4 -20,2)	14,0 (11,4 -18,0)

Abreviaturas: RIQ: rango intercuartílico.

En cuanto al evento de interés del estudio, el desarrollo de EICR crónica, la **Tabla 12** muestra la distribución de los pacientes en cuanto al grado de la misma, y la mediana de días desde el día de la infusión hasta el diagnóstico, en cada una de las cohortes analizadas.

Tabla 12. Distribución de los pacientes en función del grado y tiempo de desarrollo de EICR aguda y crónica.

		Cohorte Total (n=207)	Cohorte Seleccionada (n=104)
EICR aguda	Grado de EICR aguda, n(%)		
	0	93 (44,9)	52 (50,0)
	1	43 (20,8)	21 (20,2)
	≥ 2	71 (34,3)	31 (29,8)
	Días desde Alo-TPH, mediana (p25 -p75)	35 (24 -74)	38 (26,5 – 67,5)
EICR crónica	Grado de EICR crónica, n(%)		
	No	115 (55,6)	38 (36,5)
	Leve/Moderada	55 (26,5)	35 (33,6)
	Grave	37 (17,9)	31 (29,8)
	Días desde Alo-TPH, mediana (p25 -p75)	186.5 (132,5 -280,5)	180 (134 - 274)

Abreviaturas: Alo-TPH: trasplante alogénico, EICR: enfermedad injerto contra receptor.

Distribución del componente CD56^{bright} en función del tipo de EICR crónica

En la cohorte 1 (104 pacientes), los pacientes que desarrollaron EICR crónica y crónica severa habían sido infundidos con una menor cantidad de células CD56^{bright} (**Figura 7**). En la cohorte 2 (207 pacientes) también se confirmó que el desarrollo de EICR crónica severa se relacionaba con el número de células reguladoras recibido (**Figura 8**).

Figura 7. Porcentaje de células CD56^{bright} NK en el inóculo de los pacientes incluidos en la cohorte 1 (n=104) en función de: a) si desarrollaron EICR crónica o no; (b) si desarrollaron EICR crónica severa o no.

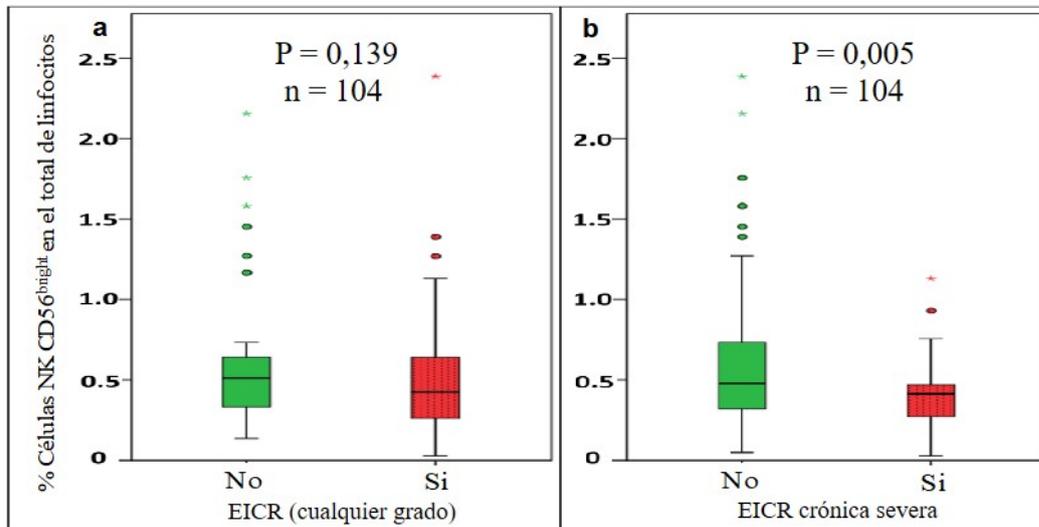
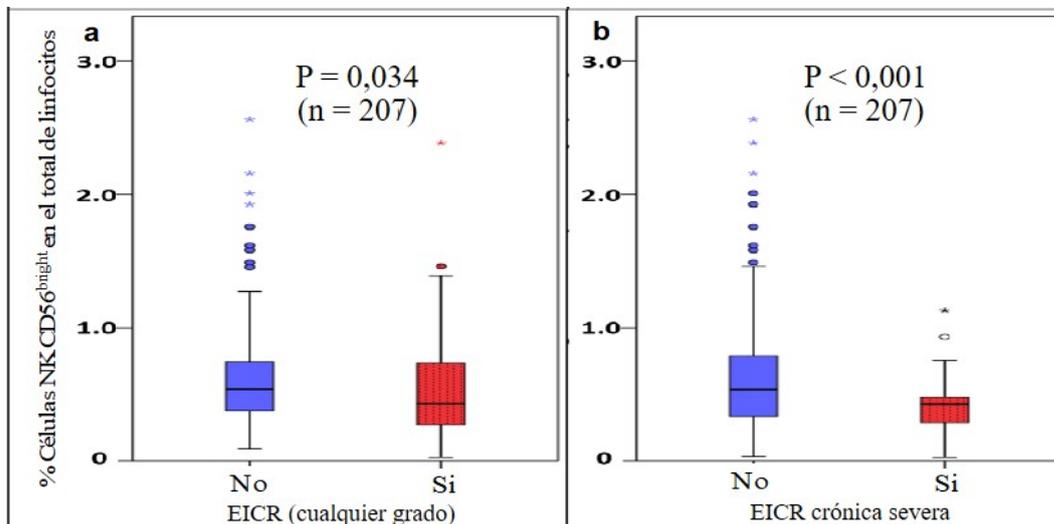


Figura 8. Porcentaje de células CD56^{bright} NK en el inóculo de los pacientes incluidos en la cohorte 2 (n=207) en función de: a) si desarrollaron EICR crónica o no; (b) si desarrollaron EICR crónica severa o no.



Análisis factores de riesgo EICRc severa en la cohorte seleccionada de 104 pacientes

Analizamos en la cohorte 1 factores relacionados con características clínica y biológicas del donante y del receptor, patología de base, acondicionamiento y

subpoblaciones linfocitarias infundidas en cuanto a su relación con el desarrollo de EICR severa. Como se muestra en la **tabla 13** tan sólo una variable clínica (disparidad en sexo siendo receptor masculino y donante femenino) y dos variables biológicas (porcentaje de CD56^{dim} y CD56^{bright} respecto al total de linfocitos) se relacionaron con el riesgo de desarrollo de EICR crónica severa en el análisis univariante.

Tabla 13. Análisis univariante en la cohorte seleccionada de 104 pacientes (progenitores de SP/donante emparentado idéntico) de parámetros relacionados con el desarrollo de EICR crónica severa.

Variable	Dicotomización	Punto de corte	Cox Univariante			
			p	RR	IC 95	
% CD4+ en total de linfocitos	AUC=0,557 (p75)	50,33	0,571	1,251	0,576	2,760
%CD8+ en total de linfocitos	AUC= 0,501 (p75)	31,27	0,822	1,257	0,171	9,235
%CD19+ en total de linfocitos	AUC=0,550 (S=0,613;1-E=0,479)	13,90	0,206	1,595	0,774	3,289
%CD56 ^{dim} NK en total de linfocitos	AUC=0,423 (S=0,452;1-E=0,630)	6,52	0,029	2,199	1,082	4,468
%CD56 ^{bright} NK en total de linfocitos	AUC=0,386 (S=0,194;1-E=0,466)	0,52	0,008	3,348	1,371	8,178
Edad del receptor al Alo-TPH	AUC= 0,518 (p75)	57	0,709	1,193	0,473	3,007
Edad del donante	AUC=0,603 (S=0,645;1-E=0,457)	45	0,362	1,390	0,684	2,823
Disparidad CMV	Si/No	---	0,143	1,743	0,829	3,663
Reactivación/infección CMV antes del día +100	Si/No	---	0,522	0,775	0,355	1,692
Disparidad en sexo [receptor masculino/donante femenino]	Receptor masculino/donante femenino vs. Resto	---	0,019	2,361	1,150	4,845
Acondicionamiento con irradiación corporal total	Si/No	---	0,644	1,220	0,525	2,834
Profilaxis EICRa con CyA/MTX	Si/No	---	0,411	21,724	0,014	33,491
Uso de Timoglobulina en acondicionamiento	Si/No	---	0,549	20,914	0,001	43,761
Acondicionamiento Mieloablatoivo	Si/No	---	0,501	1,275	0,629	2,583
Estado de la enfermedad de base al Alo-TPH	Respuesta completa vs Resto	---	0,829	1,089	0,501	2,370
Enfermedad de base: SMD/LAM vs. Resto	SMD/LAM vs. Resto	---	0,651	1,177	0,580	2,390
HLA idéntico	Si/No	---	0,688	0,664	0,090	4,887

Nota: En negrita, los valores de p <0,150 en univariante para que fueran incluidos en estudio multivariante. Abreviaturas: CD, cluster de diferenciación; NK, *natural killer*; TPH, trasplante de progenitores hematopoyéticos; CMV, citomegalovirus; EICR, enfermedad injerto contra receptor; CyA, ciclosporina A; MTX, metotrexato; ATG, timoglobulina; SMD, síndrome mielodisplásico; LAM, leucemia aguda mieloide; HLA, antígeno leucocitario humano; AUC, área bajo la curva; RR, riesgo relativo; IC, intervalo de confianza

Cuando se llevó a cabo el estudio multivariante, tan solo dos variables, el porcentaje de CD56^{bright} NK en total de linfocitos en el inóculo y la disparidad en género mantuvieron la independencia pronóstica con un riesgo relativo de sufrir EICR crónica severa de 3,2 y 2,5 veces, respectivamente (**tabla 14**).

Tabla 14. Análisis multivariante, incluyendo aquellas variables que en el univariante presentaran $p < 0,150$, en la cohorte (104 pacientes) respecto de desarrollar EICR crónica severa.

Variable	Dicotomización	Punto de corte	Cox Multivariante			
			p	RR	IC 95	
%CD56 ^{dim} NK en total de linfocitos	AUC=0,423 (S=0,452;1-E=0,630)	6,52	0,441	1,353	0,627	2,921
%CD56 ^{bright} NK en total de linfocitos	AUC=0,386 (S=0,194;1-E=0,466)	0,52	0,012	3,327	1,301	8,507
Disparidad CMV	Si/No	---	0,438	1,350	0,632	2,884
Disparidad en sexo [receptor masculino/donante femenino]	Receptor masculino/donante femenino vs. Resto	---	0,018	2,503	1,172	5,347

Nota: En negrita, los valores de p considerados significativos: $p < 0,05$.

Abreviaturas: CD, *cluster* de diferenciación; NK, *natural killer*; CMV, citomegalovirus; EICR, enfermedad injerto contra receptor; AUC, área bajo la curva; RR, riesgo relativo; IC, intervalo de confianza

Quisimos también analizar si existían parámetros relacionados no solamente con el desarrollo de EICR crónica severa, si no con la presencia de esta complicación inmunológica post-trasplante, en cualquiera de sus posibles grados. Como se muestra en la **tabla 15**, en esta cohorte de 104 pacientes tan sólo cuatro variables cumplieron la condición establecida de valor de $p (< 0,150)$ para ser consideradas en el estudio multivariante: %CD56^{dim} NK en total de linfocitos, %CD56^{bright} NK en total de linfocitos, disparidad en el género (receptor masculino/ donante femenino) y el estado de la enfermedad de base al alo-TPH (RC vs. otra)

Tabla 15. Análisis univariante en la cohorte 1 de parámetros relacionados con el desarrollo de cualquier grado de EICR crónica.

Variable	Dicotomización	Punto de corte	Cox Univariante			
			p	RR	IC 95	
% CD4+ en total de linfocitos	AUC=0,557 (p75)	50,33	0,244	1,368	0,808	2,315
%CD8+ en total de linfocitos	AUC= 0,501 (p75)	31,27	0,641	1,399	0,342	5,728
%CD19+ en total de linfocitos	AUC=0,550 (S=0,613;1-E=0,479)	13,90	0,262	1,322	0,812	2,151
%CD56 ^{dim} NK en total de linfocitos	AUC=0,423 (S=0,452;1-E=0,630)	6,52	0,023	1,751	1,079	2,841
%CD56 ^{bright} NK en total de linfocitos	AUC=0,386 (S=0,194;1-E=0,466)	0,52	0,034	1,752	1,042	2,947
Edad del receptor al Alo-TPH	AUC= 0,518 (p75)	57	0,623	0,865	0,486	1,541
Edad del donante	AUC=0,603 (S=0,645;1-E=0,457)	45	0,591	1,143	0,702	1,862
Disparidad CMV	Si/No	---	0,228	1,383	0,816	2,344
Reactivación/infección CMV antes del día +100	Si/No	---	0,717	1,116	0,616	2,023
Disparidad en sexo [receptor masculino/donante femenino]	Receptor masculino/donante femenino vs. Resto	---	0,028	1,775	1,065	2,958
Acondicionamiento con irradiación corporal total	Si/No	---	0,473	1,235	0,694	2,198
Profilaxis EICRa con CyA/MTX	Si/No	---	0,230	0,570	0,228	1,426
Uso de Timoglobulina en acondicionamiento	Si/No	---	0,377	20,954	0,024	1,8011
Acondicionamiento Mieloablatoivo	Si/No	---	0,297	1,294	0,797	2,100
Estado de la enfermedad de base al Alo-TPH	Respuesta completa vs Resto	---	0,104	1,518	0,918	2,509
Enfermedad de base: SMD/LAM vs. Resto	SMD/LAM vs. Resto	---	0,548	0,862	0,531	1,399
HLA idéntico	Si/No	---	0,514	0,625	0,153	2,561

Nota: El punto de corte para la dicotomización de las variables continuas: se eligió el p75 si el AUC de la curva ROC se situó entre 0,450 y 0,549. En caso contrario, se eligió el valor con mejor sensibilidad y especificidad según la curva ROC. Nota: En negrita, los valores de p <0,150 en el análisis univariante que fueron considerados en el multivariante.

Abreviaturas: CD, *cluster* de diferenciación; NK, *natural killer*; TPH, trasplante de progenitores hematopoyéticos; CMV, citomegalovirus; EICR, enfermedad injerto contra receptor; CyA, ciclosporina; MTX, metotrexato; ATG, timoglobulina; SMD, síndrome mielodisplásico; LAM, leucemia aguda mieloide; HLA, antígeno leucocitario humano; AUC, área bajo la curva; RR, riesgo relativo; IC, intervalo de confianza

Cuando estos resultados se analizaron con una aproximación multivariante a partir del análisis anterior, tan solo la disparidad en género (donante mujer y receptor varón) mantuvo la significación pronóstica con un riesgo relativo de sufrir EICR crónica de 1,9 (tabla 16).

Tabla 16. Análisis multivariante, incluyendo aquellas variables que en el univariante presentaran $p < 0,150$, en la cohorte 1 en relación con el desarrollo de cualquier grado de EICR crónica.

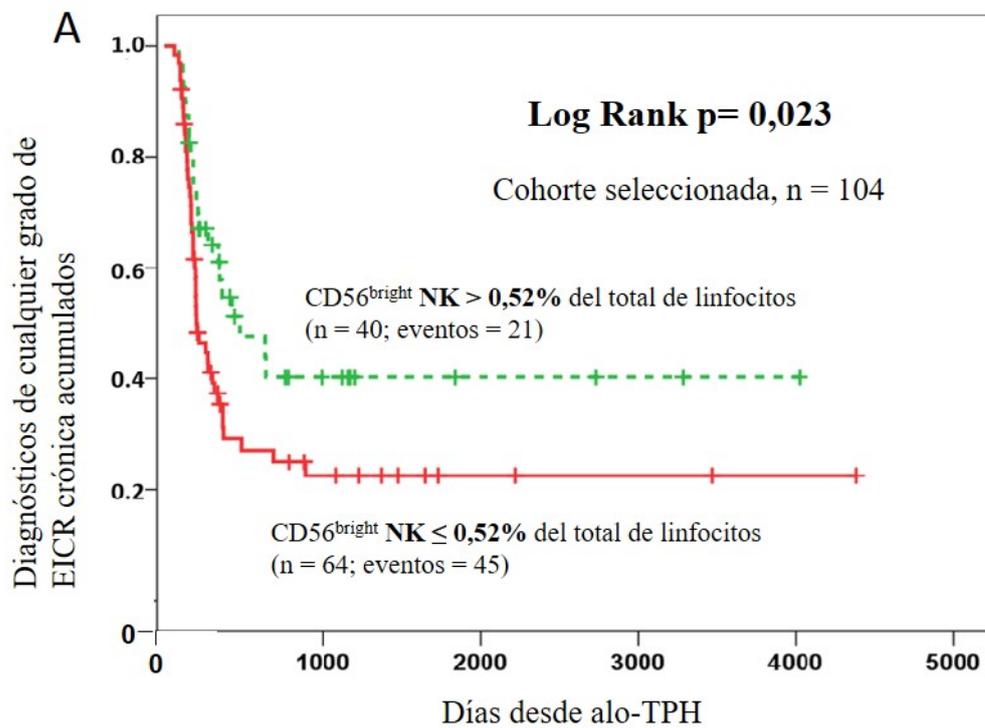
Variable	Dicotomización	Punto de corte	Cox Multivariante			
			P	RR	IC 95	
%CD56 ^{dim} NK en total de linfocitos	AUC=0,423 (S=0,452;1-E=0,630)	6,52	0,109	1,508	0,913	2,492
%CD56 ^{bright} NK en total de linfocitos	AUC=0,386 (S=0,194;1-E=0,466)	0,52	0,119	1,551	0,893	2,691
Disparidad en sexo [receptor masculino/donante femenino]	Receptor masculino/donante femenino vs. Resto	---	0,015	1,904	1,133	3,200
Estado de la enfermedad de base al Alo-TPH	Respuesta completa vs Resto	---	0,140	1,476	0,880	2,477

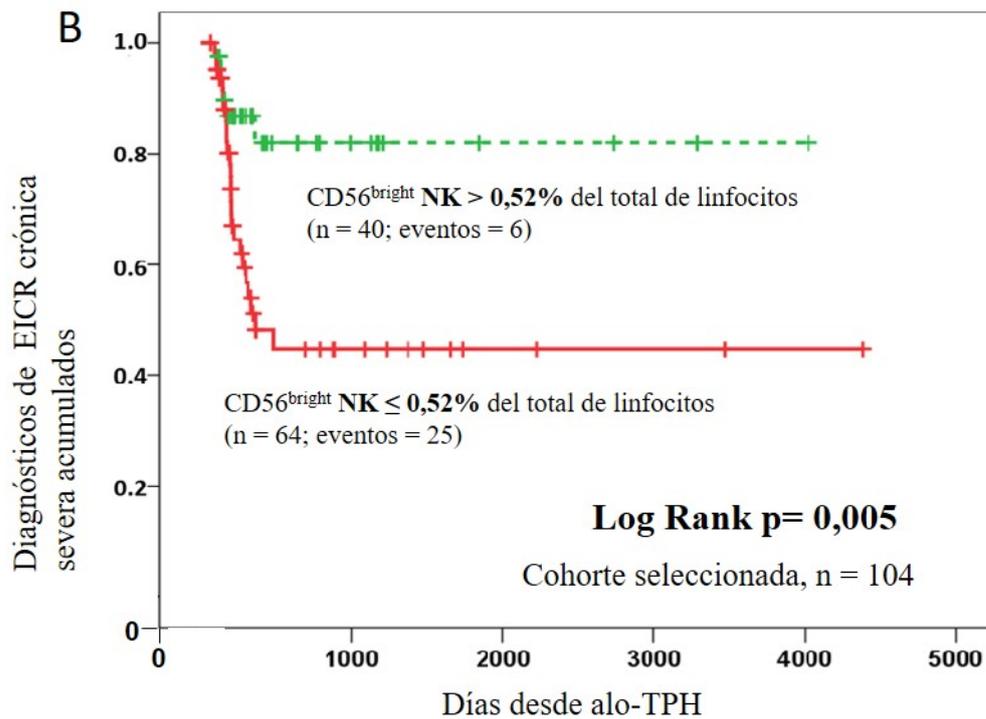
Nota: En negrita, los valores de p considerados significativos $p < 0,05$.

Abreviaturas: CD, *cluster* de diferenciación; NK, *natural killer*; CMV, citomegalovirus; TPH, trasplante de progenitores hematopoyéticos; EICR, enfermedad injerto contra receptor; AUC, área bajo la curva; RR, riesgo relativo; IC, intervalo de confianza.

La **figura 9** representa el tiempo hasta el desarrollo de EICR crónica en cualquier grado (**A**) y en EICR crónica severa (**B**) en función del % de células NK 56^{bright} en el total de linfocitos infundidas. Tanto la **figura 9.A** como la **B** muestra como aquellos pacientes con $> 0,52$ % de células NK 56^{bright} en el total de linfocitos infundidos presentaban una mediana de tiempo hasta el desarrollo de EICR crónica en cualquier grado (en el caso de la **A**) y en EICR crónica severa (para la **B**) significativamente mayor de la de aquellos pacientes que presentaban células NK 56^{bright} $\leq 0,52\%$.

Figura 9. Kaplan Meier, para la cohorte 1, en función de presentar \leq ó $>$ de 0,52% CD56^{bright} NK en total de linfocitos en el inóculo, para los eventos: A) cualquier grado de EICR crónica; B) EICR crónica severa.





Análisis de factores de riesgo EICRc en cohorte 2.

En un segundo análisis se añadieron aquellos pacientes con alo-TPH de donante no emparentado, de donante haploidéntico y aquellos pacientes con muertes o recaídas tempranas, antes del día +100. Esta cohorte global estaba compuesta por 207 pacientes. De manera similar a lo realizado en la cohorte 1 quisimos saber si en este grupo de pacientes existían factores pronósticos de desarrollar EICR severa, tal como muestra la **tabla 17**.

Tabla 17. Análisis univariante en la cohorte 2 respecto de desarrollar EICR crónica severa.

Variable	Dicotomización	Punto de corte	Cox Univariante			
			p	RR	IC 95	
% CD4+ en total de linfocitos	AUC=0.557 (p75)	50,33	0,262	1,516	0,733	3,135
%CD8+ en total de linfocitos	AUC= 0.501 (p75)	31,27	0,980	1,009	0,488	2,087
%CD19+ en total de linfocitos	AUC=0.550 (S=0.613;1-E=0.479)	13,90	0,629	0,852	0,444	1,632
%CD56 ^{dim} NK en total de linfocitos	AUC=0.423 (S=0.452;1-E=0.630)	6,52	0,238	1,475	0,774	2,811
%CD56 ^{bright} NK en total de linfocitos	AUC=0.386 (S=0.194;1-E=0.466)	0,52	0,001	3,716	1,697	8,138
Edad del receptor al Alo-TPH	AUC= 0.518 (p75)	57	0,540	0,783	0,358	1,714
Edad del donante	AUC=0.603 (S=0.645;1-E=0.457)	45	0,062	1,856	0,970	3,549
Disparidad CMV	Si/No	---	0,224	1,511	0,777	2,936
Reactivación/infección CMV antes del día +100	Si/No	---	0,308	1,431	0,718	2,852
Disparidad en sexo [receptor masculino/donante femenino]	Receptor masculino/donante femenino vs. Resto	---	0,051	1,964	0,997	3,868
Acondicionamiento con irradiación corporal total	Si/No	---	0,756	0,891	0,431	1,842
Profilaxis EICHa con CyA/MTX	Si/No	---	0,927	1,017	0,715	1,446
Uso de Timoglobulina en acondicionamiento	Si/No	---	0,055	3,176	0,974	10,357
Acondicionamiento Mieloablatoivo	Si/No	---	0,891	1,046	0,549	1,994
Estado de la enfermedad de base al Alo-TPH	Respuesta completa vs Resto	---	0,840	1,072	0,546	2,108
Enfermedad de base: SMD/LAM vs. Resto	SMD/LAM vs. Resto	---	0,353	1,358	0,711	2,893
HLA idéntico	Si/No	---	0,021	0,248	0,076	0,808
Donante no emparentado	Si/No	---	0,101	0,419	0,148	1,183

Nota: El punto de corte para la dicotomización de las variables continuas: se eligió el p75 si el AUC de la curva ROC se situó entre 0,450 y 0,549. En caso contrario, se eligió el valor con mejor sensibilidad y especificidad según la curva ROC.

En negrita, los valores de p con p <0,150 en el análisis univariante que fueron posteriormente utilizados en el multivariante.

Abreviaturas: CD, cluster de diferenciación; NK, *Natural killer*; TPH, trasplante de progenitores hematopoyéticos; CMV, citomegalovirus; EICR, enfermedad injerto contra receptor; CyA, ciclosporina; MTX, metotrexato; ATG, timoglobulina; SMD, síndrome mielodisplásico; LAM, leucemia aguda mieloide; HLA, antígeno leucocitario humano; AUC, área bajo la curva; RR, riesgo relativo; IC, intervalo de confianza

De las dos variables biológicas (% CD56^{dim} y % CD56^{bright} en material infundido) y las cinco clínicas (edad del donante, disparidad de sexo entre donante y receptor, empleo de ATG, identidad HLA y donante familiar o no), tres variables, el porcentaje de CD56^{bright} NK en total de linfocitos en el inóculo, la disparidad en género y la identidad HLA mantuvieron la independencia pronóstica en el Cox multivariante en la cohorte total. Los dos primeros parámetros se relacionaron con un riesgo relativo de sufrir EICR crónica severa de 3,968 y 2,552 respectivamente. La identidad total en el HLA se mostró como factor protector, con un RR de 0,250 (**tabla 18**).

Tabla 18. Análisis multivariante, incluyendo aquellas variables que en el univariante presentaran p<0,150, en la cohorte 2 respecto de desarrollar EICR crónica severa.

Variable	Dicotomización	Punto de corte	Cox Multivariante			
			p	RR	IC 95	
%CD56^{bright} NK en total de linfocitos	AUC=0,386 (S=0,194;1-E=0,466)	0,52	0,001	3,968	1,758	8,955
Edad del donante	AUC=0,603 (S=0,645;1-E=0,457)	45	0,366	1,381	0,686	2,781
Disparidad en sexo [receptor masculino/donante femenino]	Receptor masculino/donante femenino vs. Resto	---	0,010	2,552	1,250	5,209
Uso de Timoglobulina en acondicionamiento	Si/No	---	0,605	1,534	0,303	7,757
HLA idéntico	Si/No	---	0,024	0,250	0,075	0,833
Donante no emparentado	Si/No	---	0,943	0,949	0,223	4,041

Nota: En negrita, los valores de p considerados significativos: p < 0,05.

Abreviaturas: CD, cluster de diferenciación; NK, *natural killer*; CMV, citomegalovirus; EICR, enfermedad injerto contra receptor; AUC, área bajo la curva; RR, riesgo relativo; IC, intervalo de confianza

Analizamos también en esta cohorte el valor predictivo de diversas variables en relación con el riesgo del desarrollo de cualquier tipo de EICR crónica (**tabla 19**). En este caso, dos parámetros biológicos (% CD4+ en total de linfocitos y % CD56^{bright} en total de linfocitos) y cinco clínicos (edad del donante, disparidad de sexo, uso de ATG, HLA idéntico y tipo de donante no emparentado) se asocian de manera significativa con la presencia de EICR crónica.

Tabla 19. Análisis univariante en la cohorte 2 respecto de desarrollar cualquier grado de EICR crónica.

Variable	Dicotomización	Punto de corte	Cox Univariante			
			p	RR	IC 95	
% CD4+ en total de linfocitos	AUC=0,557 (p75)	50,33	0,010	1,814	1,155	2,850
%CD8+ en total de linfocitos	AUC= 0,501 (p75)	31,27	0,064	0,607	0,358	1,030
%CD19+ en total de linfocitos	AUC=0,550 (S=0,613;1-E=0,479)	13,90	0,571	0,887	0,585	1,344
%CD56 ^{dim} NK en total de linfocitos	AUC=0,423 (S=0,452;1-E=0,630)	6,52	0,080	1,446	0,957	2,185
%CD56 ^{bright} NK en total de linfocitos	AUC=0,386 (S=0,194;1-E=0,466)	0,52	0,007	1,795	1,174	2,744
Edad del receptor al Alo-TPH	AUC= 0,518 (p75)	57	0,402	0,809	0,492	1,329
Edad del donante	AUC=0,603 (S=0,645;1-E=0,457)	45	0,036	1,556	1,028	2,353
Disparidad CMV	Si/No	---	0,407	1,203	0,778	1,860
Reactivación/infección CMV antes del día +100	Si/No	---	0,067	1,545	0,969	2,463
Disparidad en sexo [receptor masculino/donante femenino]	Receptor masculino/donante femenino vs. Resto	---	0,016	1,722	1,106	2,681
Acondicionamiento con irradiación corporal total	Si/No	---	0,742	1,084	0,671	1,752
Profilaxis EICHa con CyA/MTX	Si/No	---	0,253	0,869	0,683	1,106
Uso de Timoglobulina en acondicionamiento	Si/No	---	0,008	2,440	1,262	4,717
Acondicionamiento Mieloablatoivo	Si/No	---	0,423	1,183	0,784	1,785
Estado de la enfermedad de base al Alo-TPH	Respuesta completa vs Resto	---	0,312	0,808	0,534	1,222
Enfermedad de base: SMD/LAM vs. Resto	SMD/LAM vs. Resto	---	0,801	0,948	0,628	1,431
HLA idéntico	Si/No	---	0,029	0,507	0,276	0,932
Donante no emparentado	Si/No	---	0,025	0,521	0,295	0,921

Nota: En negrita, los valores con p <0.150 del análisis univariante que fueron posteriormente incluidos en el análisis multivariante.

Abreviaturas: CD, cluster de diferenciación; NK, *natural killer*; TPH, trasplante de progenitores hematopoyéticos; CMV, citomegalovirus; EICR, enfermedad injerto contra receptor; Cya, ciclosporina; MTX, metotrexato; ATG, timoglobulina; SMD, síndrome mielodisplásico; LAM, leucemia aguda mieloide; HLA, antígeno leucocitario humano; AUC, área bajo la curva; RR, riesgo relativo; IC, intervalo de confianza.

Cuando llevamos a cabo el estudio multivariante, al igual que en la cohorte 1, tanto el % de CD56^{bright} infundidas como la disparidad de sexo se relacionaron con el riesgo de desarrollo de EICR crónica con RR de 1,693 y 2,020 respectivamente, aunque en el caso de la cohorte 2, la identidad HLA entre donante y receptor no resultó ser una variable relevante en este riesgo (**tabla 20**).

Tabla 20. Análisis multivariante, incluyendo aquellas variables que en el univariante presentaran p<0,150, en la cohorte 2 respecto de desarrollar EICR crónica de cualquier grado.

Variable	Dicotomización	Punto de corte	Cox Multivariante			
			p	RR	IC 95	
% CD4+ en total de linfocitos	AUC=0,557 (p75)	50,33	0,210	1,392	0,830	2,333
%CD8+ en total de linfocitos	AUC= 0,501 (p75)	31,27	0,408	0,785	0,442	1,393
%CD56 ^{dim} NK en total de linfocitos	AUC=0,423 (S=0,452;1-E=0,630)	6,52	0,300	1,275	0,805	2,018
%CD56 ^{bright} NK en total de linfocitos	AUC=0,386 (S=0,194;1-E=0,466)	0,52	0,029	1,693	1,055	2,716
Edad del donante	AUC=0,603 (S=0,645;1-E=0,457)	45	0,578	1,137	0,723	1,790
Reactivación/infección CMV antes del día +100	Si/No	---	0,307	1,304	0,783	2,170
Disparidad en sexo [receptor masculino/donante femenino]	Receptor masculino/donante femenino vs. Resto	---	0,004	2,020	1,259	3,241
Uso de Timoglobulina en acondicionamiento	Si/No	---	0,527	1,362	0,524	3,540
HLA idéntico	Si/No	---	0,090	0,586	0,316	1,087
Donante no emparentado	Si/No	---	0,684	0,823	0,323	2,099

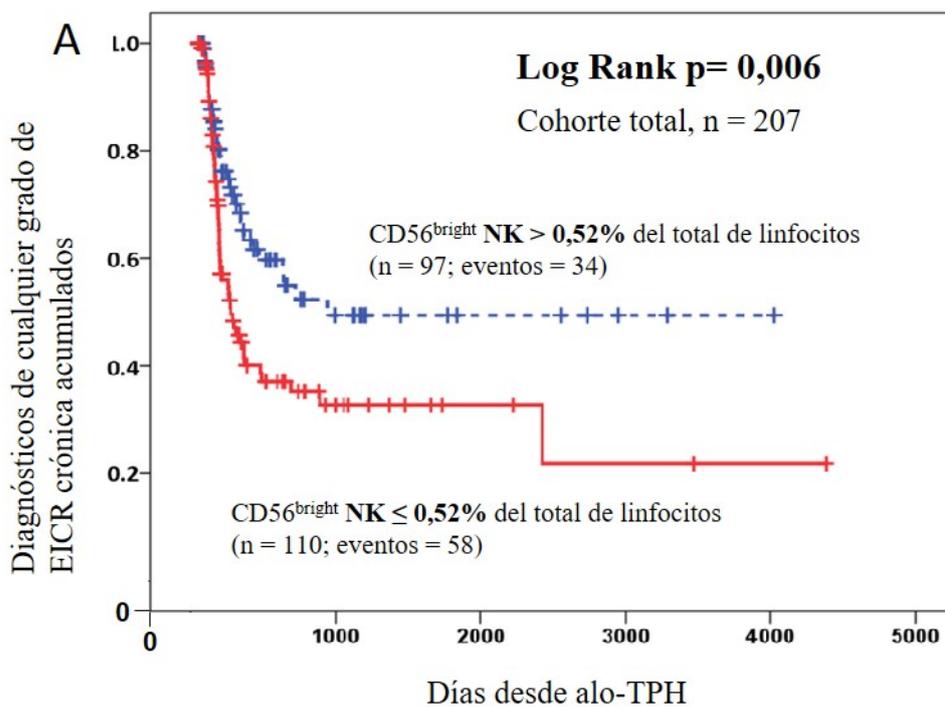
Nota: El punto de corte para la dicotomización de las variables continuas: se eligió el p75 si el AUC de la curva ROC se situó entre 0,450 y 0,549. En caso contrario, se eligió el valor con mejor sensibilidad y especificidad según la curva ROC.

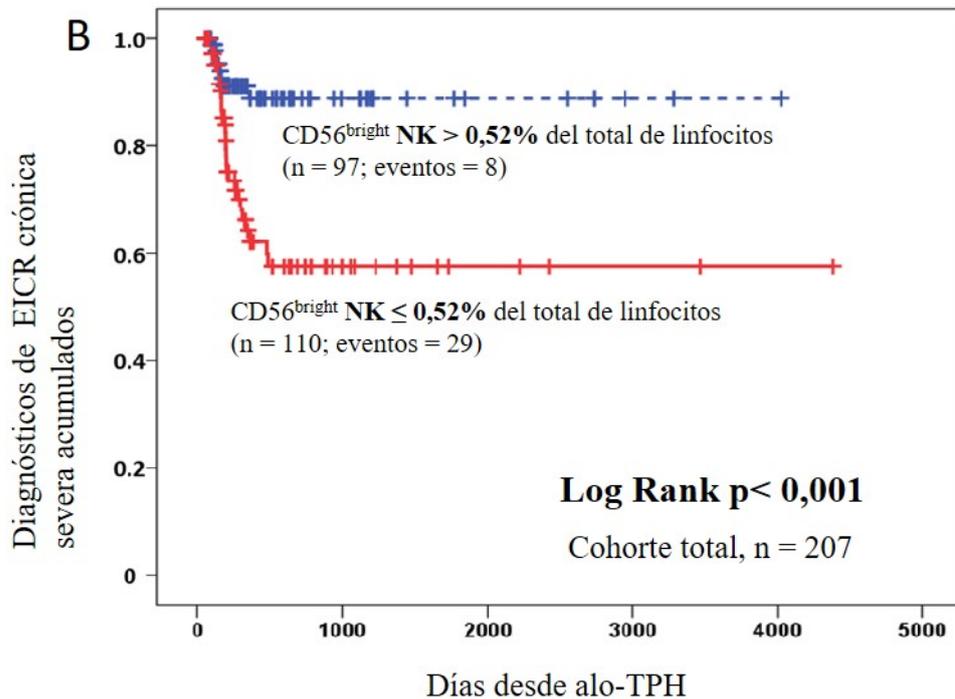
Nota: En negrita, los valores considerados significativos p <0.05.

Abreviaturas: CD, cluster de diferenciación; NK, *natural killer*; CMV, citomegalovirus; EICR, enfermedad injerto contra receptor; AUC, área bajo la curva; RR, riesgo relativo; IC, intervalo de confianza.

La **figura 10** representa el tiempo hasta el desarrollo de EICR crónica en cualquier grado (**A**) y en EICR crónica severa (**B**) en función del % de células NK 56^{bright} en el total de linfocitos infundidas. Tanto la **figura 10.A** como la **B** muestra como aquellos pacientes con $> 0,52\%$ de células NK 56^{bright} en el total de linfocitos infundidos presentaban una mediana de tiempo hasta el desarrollo de EICR crónica en cualquier grado (en el caso de la **A**) y en EICR crónica severa (para la **B**) significativamente mayor de la de aquellos pacientes que presentaban células NK $56^{bright} \leq 0,52\%$.

Figura 10. Kaplan Meier, para la cohorte 2, en función de presentar \leq ó $>$ de $0,52\%$ $CD56^{bright}$ NK en total de linfocitos en el inóculo, para los eventos: a) cualquier grado de EICR crónica; b) EICR crónica severa.





4.4. Discusión

En el alo-TPH de progenitores hematopoyéticos la SP ha ido desplazando como fuente del inóculo a la MO a lo largo del tiempo y en la actualidad más del 75% de estos procedimientos emplean este producto rico no solo en células CD34+ sino también en otras poblaciones celulares. El menor número de complicaciones y mayor comodidad para el donante y una mejor dinámica y tasas de injerto en el receptor se han propuesto como las causas de esta tendencia, a expensas de una frecuencia de EICR más elevada, cuando se compara con los procedimientos realizados usando como fuente la MO en el contexto de los trasplantes de DE.²⁴⁷ Esta mayor incidencia de EICR se ha relacionado con distintas poblaciones celulares del inóculo, desde poblaciones T, B a células dendríticas.^{248,249}

Recientemente, el grupo canadiense de trasplante de progenitores hematopoyéticos, en el contexto de un ensayo aleatorizado fase 3 con alo-TPH de donante emparentado,²¹² comparó el impacto del uso de PH procedentes de SP o MO, en ambos casos tras recibir

G-CSF. Como era esperable, los receptores de inóculos procedentes de MO que habían recibido G-CSF mostraron una menor frecuencia de EICR crónica.²⁴⁵ En un subanálisis posterior de la composición inmune del inóculo, los autores encontraron que esa menor tasa de EICR crónica en los receptores de inóculo de medula ósea se relacionaba de manera significativa con presentar una mayor proporción de células NK CD56^{bright} (reguladoras).²⁴⁵ Además, este mismo grupo en otro estudio cuyo objetivo era encontrar biomarcadores que permitieran diagnosticar la EICR, mostraron la importancia de este compartimento celular al observar una correlación significativa entre un número disminuido de células CXCR3+CD56^{bright} y el desarrollo de EICR crónica en adultos, lo que les otorga una evidencia adicional.²⁵⁰ A su vez relacionaron niveles elevados de CXCL10 (biomarcador que presentó mayor significación estadística) con una disminución del porcentaje de estas células NK reguladoras, CXCR3+CD56^{bright}.²⁵⁰

En nuestro trabajo, hemos validado esa relación significativa de la proporción de células NK CD56^{bright} en el inóculo movilizado con G-CSF de SP en el contexto del alo-TPH de DE. Hemos mostrado su independencia pronóstica respecto de otros factores, subpoblaciones inmunes y variables clínicas, que han sido asociados con la EICR crónica. Además, en un segundo análisis incluyendo toda la cohorte de pacientes con alo-TPH, independientemente de fuente de progenitores y/o donante familiar, esa relación independiente se mantuvo. La asociación entre la fracción CD56^{bright} NK en el inóculo y la EICR crónica fue mayor en caso de que esta última fuera de grado severo, tanto en la cohorte que mimetizaba los criterios de inclusión del grupo canadiense (cohorte 1), como en la cohorte total (cohorte 2). Queremos resaltar la importancia y utilidad de esta correlación en el grupo de pacientes con EICR crónica severa, tal y como destacaron recientemente un panel de expertos: “el grupo en el que es crucial el desarrollo de biomarcadores que permitan su prevención, ya que las formas leves de EICR crónica no han mostrado empeoramiento de la mortalidad y/o morbilidad y su prevención no se estima crítica ya que podría, paradójicamente llevar a una peor evolución”.²⁵¹

Al contrario de lo que ocurre con el compartimento CD56^{dim}, cuya principal acción es citolítica, la fracción CD56^{bright} de las células NK presentan un papel regulador, con un predominio de la maquinaria de secreción de citoquinas frente a una capacidad citotóxica atenuada. Las principales citoquinas que producen, dependiendo de las condiciones precisas de cada situación, son INF γ , TNF α , factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, IL-10 e IL-13.^{165,166,176} Este desequilibrio hacia un

fenotipo celular menos citotóxico y más inmunotolerante se postula como el principal mecanismo de acción que puede explicar la relación de una disminución del compartimento CD56^{bright} y el desarrollo de EICR. Las dos funciones fundamentales de las CD56^{bright} NK en el desarrollo de la EICR están relacionadas con el grado de activación de las células dendríticas tolerogénicas a partir de los monocitos y la generación de células T reguladoras vía secreción de IL-10.^{181,182,252} Dentro de las células *natural killer*, sólo la fracción CD56^{bright} expresa los receptores de alta afinidad para la IL-2, siendo capaces de proliferar a concentraciones picomolares de esta citoquina.¹⁶² De manera interesante, la población CD56^{bright} NK se incrementa en los pacientes con cáncer sólido tratados con dosis diarias bajas de IL-2.²⁵³ Además, la expansión de las células CD56^{bright} NK, y su correlación con la respuesta al tratamiento, ha sido comunicada en dos estudios en los que se analizaba el tratamiento de la esclerosis múltiple y uveítis con daclizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el receptor de la IL-2.^{194,254} De acuerdo con nuestros resultados y los comunicados recientemente,²¹² resulta tentador revisar el papel de este anticuerpo monoclonal en el arsenal terapéutico de la EICR y su potencial modulación en función de las dinámicas del compartimento CD56^{bright} NK.^{255,256}

Actualmente se reconoce que la manipulación de inóculo con el fin de alterar su composición celular puede tener impacto en el desarrollo posterior de EICR crónica. Por ejemplo, la depleción de células T y B *in vivo* con ATG o alemtuzumab, o la depleción *in vivo* de células T y B en el contexto del trasplante haploidéntico usando CY post-trasplante puede reducir la incidencia de EICR crónica.^{257,258} En el contexto de los inóculos movilizados con G-CSF, un estudio encontró que la cantidad de las subpoblaciones T de memoria y naïve se correlacionaban con el número de infecciones y el desarrollo de EICR aguda y, además, la proporción de dichas poblaciones dependía de si la fuente de progenitores procedía de una médula ósea estimulada con G-CSF.²⁵⁹ También se han comunicado resultados que no llegan a validar estas asociaciones. Es el caso del estudio BMT CTN 0201, en el cual se encontró que la proporción de células dendríticas y células T naïve en el inóculo de médula ósea infundido se asociaban con una mejora en la supervivencia global pero no con el desarrollo de EICR crónica.¹⁵⁴ Sin embargo ninguno de estos trabajos incluyó entre sus determinaciones la fracción CD56^{bright} NK.

El uso de biomarcadores en la predicción, diagnóstico y monitorización del tratamiento de las complicaciones relacionadas con el alo-TPH es un campo en crecimiento. En el contexto de la EICR aguda, recientemente se han iniciado los primeros ensayos clínicos en los que la determinación de biomarcadores guía la intervención con inmunosupresores (Protocolo 1501 *Blood and marrow trasplant clinical trials network*).²⁶⁰ Sin embargo, en el caso de la EICR crónica, el establecimiento de biomarcadores predictivos sigue un curso más lento por diversas causas, entre las que destacan los casos de solapamiento con la EICR aguda, una horquilla de tiempo mucho más amplia para el debut de la complicación, un impacto más variable en función del órgano afectado y la falta de un número adecuado de pacientes en estudios multicéntricos. El hallazgo de la proporción células CD56^{bright} NK como predictor de EICR crónica severa en un estudio que parte de un ensayo clínico controlado, y su validación en nuestra cohorte, independiente y más cercana a la clínica del “ mundo real” son dos factores a favor de su uso como biomarcador. Sin embargo, sería necesaria la estandarización de la determinación citométrica (monoclonales, eventos, *gating*...) para la generalización de los resultados. En nuestra opinión, la principal limitación de nuestro estudio, así como el de Karimnia y colaboradores, reside en la determinación de un número de poblaciones inmunes limitada, resultando imprescindible el diseño de estudios, a poder ser multicéntricos, que pongan en contexto todos los compartimentos celulares asociados con el desarrollo de EICR crónica.

Tanto el estudio de Karimnia como el nuestro se centra en productos movilizados con G-CSF, que representa el esquema más generalizado, del que se cuenta con mayor experiencia y sigue constituyendo la estrategia de movilización estándar. Plerixafor, un antagonista selectivo reversible del receptor de quimiocina CXCR4, se ha mostrado como un agente movilizador seguro y rápido, aunque su eficacia en monoterapia parece ser inferior a la conseguida históricamente con G-CSF. Sin embargo, estudios recientes sugieren la posibilidad de una menor tasa de EICR crónica con el uso de plerixafor.^{261,262} Recientemente, Wong y colaboradores han comunicado que Plerixafor es capaz de movilizar un producto enriquecido en células NK^{bright}, postulando que ese incremento podría ser el responsable de la menor tasa de EICR crónica con este agente.²⁶³ Aunque es una hipótesis atractiva, sin embargo, estos resultados deben ser validados en un contexto clínico.

4.5. Conclusiones

- En nuestro trabajo, en una serie de pacientes que cumplieran los criterios de inclusión del estudio pivotal de referencia, hemos validado la relación significativa entre la proporción de células NK CD56^{bright} y la EICR crónica y además hemos mostrado su independencia pronóstica con respecto a otros factores, subpoblaciones linfocitarias y variables clínicas que también han sido asociadas con la EICR crónica.
- Ampliando los criterios de inclusión a una serie más cercana a una cohorte de alo-TPH en la clínica rutinaria, se mantiene la relación significativa entre la proporción de células NK CD56^{bright} y la EICR crónica y su independencia pronóstica con respecto a otros factores, subpoblaciones linfocitarias y variables clínicas que también han sido asociadas con la EICR crónica.
- Tanto en la cohorte seleccionada como en la extendida, esta asociación entre la fracción NK CD56^{bright} en el inóculo y la EICR crónica fue mayor en caso de que esta última fuera de grado severo.

CONCLUSIONES GENERALES

5. CONCLUSIONES GENERALES

- La aparición de una expansión persistente de linfocitos T citotóxicos tras alo-TPH es un evento relativamente frecuente, que se asocia a variables propias del procedimiento, como el acondicionamiento de IR o el uso de ATG , y con eventos del periodo post-alo-TPH, como la reactivación del CMV.
- A pesar del hallazgo frecuente de reordenamientos clonales y oligoclonales del TCR en los linfocitos T, la ausencia de mutaciones en *STAT3* y la tendencia a la normalización de dichas expansiones a largo plazo, apoyan su naturaleza fisiológica, confirmada clínicamente por la ausencia de consecuencias clínicas negativas en la evolución post-trasplante.
- En nuestro trabajo hemos validado la relación entre la proporción de células NK CD56^{bright} y la EICR y además hemos mostrado su independencia pronóstica con respecto a otros factores, subpoblaciones linfocitarias y variables clínica que también han sido asociadas con la EICR. Esta asociación entre la fracción NK CD56^{bright} en el inóculo y la EICR crónica fue mayor en caso de que esta última fuera de grado severo.

REFERENCIAS

6. REFERENCIAS

1. Carreras E, Rovira M, Zeberio I, Valcárcel D. Manual de Trasplante Hematopoyético 5ª Edición. Barcelona.
2. Burgaleta Alonso de Ozalla C, Alegre Amor A, Franco Villegas C, et al. Manual del médico residente en hematología y hemoterapia. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia.; 295-299, 305-311 p.
3. Sans-Sabrafen J. Hematología clínica. Elsevier.; 789-808 p.
4. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15(12):1628–33.
5. Deeg HJ, Sandmaier BM. Who is fit for allogeneic transplantation? *Blood* 2010;116(23):4762–4770.
6. Gyurkocza B, Sandmaier BM. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: One size does not fit all. *Blood*.
7. Mehta RS, Rezvani K. Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. *Virulence* 2016;7(8):901–916.
8. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, et al. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol* 2016;7:507.
9. Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: An update. *Blood* 2010;115(19):3861–3868.
10. Danby R, Rocha V. Improving engraftment and immune reconstitution in umbilical cord blood transplantation. *Frontiers in Immunology*;5(FEB):
11. Martin PS, Li S, Nikiforow S, et al. Infused total nucleated cell dose is a better predictor of transplant outcomes than CD34+cell number in reduced-intensity mobilized peripheral blood allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Haematologica* 2016;101(4):499–505.
12. Remberger M, Törlén J, Ringdén O, et al. Effect of Total Nucleated and CD34(+) Cell Dose on Outcome after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21(5):889–93.
13. Moss P, Rickinson A. Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation. *Nature Reviews Immunology* 2005;5(1):9–20.
14. Fry TJ, Mackall CL. Immune reconstitution following hematopoietic progenitor cell transplantation: Challenges for the future. *Bone Marrow Transplant* 2005;35S53–S57.
15. Thiant S, Yakoub-Agha I, Magro L, et al. Plasma levels of IL-7 and IL-15 in the first month after myeloablative BMT are predictive biomarkers of both acute GVHD and relapse. *Bone Marrow Transplant* 2010;45(10):1546–1552.

16. Rufer N, Br??mmendorf TH, Chapuis B, Helg C, Lansdorp PM, Roosnek E. Accelerated telomere shortening in hematological lineages is limited to the first year following stem cell transplantation. *Blood* 2001;97(2):575–577.
17. Bains I, Antia R, Callard R, Yates AJ. Quantifying the development of the peripheral naive CD4+ T-cell pool in humans. *Blood* 2009;113(22):5480–5487.
18. Gennery AR, Maggina P. Infection following haematopoietic stem cell transplantation. *Paediatr Child Health (Oxford)* 2014;24(6):236–241.
19. Toubert A, Glauzy S, Douay C, Clave E. Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: Never say never again. *Tissue Antigens* 2012;79(2):83–89.
20. Hakim FT, Memon SA, Cepeda R, et al. Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *J Clin Invest* 2005;115(4):930–939.
21. Castermans E, Hannon M, Dutrieux J, et al. Thymic recovery after allogeneic hematopoietic cell transplantation with non-myeloablative conditioning is limited to patients younger than 60 years of age. *Haematologica* 2011;96(2):298–306.
22. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 2011;117(14):3921–3928.
23. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003;9(9):1144–1150.
24. Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: Safety profile and detection kinetics. *Blood* 2011;117(3):1061–1070.
25. Bolotin E, Smogorzewska M, Smith S, Widmer M, Weinberg K. Enhancement of thymopoiesis after bone marrow transplant by in vivo interleukin-7. *Blood* 1996;88:1887–1894.
26. Guimond M, Fry TJ, Mackall CL. Cytokine signals in T-cell homeostasis. *J Immunother* 2005;28(4):289–294.
27. Jameson SC. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2002;2(8):547–556.
28. Kassiotis G, Garcia S, Simpson E, Stockinger B. Impairment of immunological memory in the absence of MHC despite survival of memory T cells. *Nat Immunol* 2002;3(3):244–250.
29. Guimond M, Veenstra RG, Grindler DJ, et al. Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+T cells. *Nat Immunol* 2009;10(2):149–157.
30. Van Heijst JWJ, Ceberio I, Lipuma LB, et al. Quantitative assessment of T cell repertoire recovery after hematopoietic stem cell transplantation. *Nat Med* 2013;19(3):372–377.
31. Yew PY, Alachkar H, Yamaguchi R, et al. Quantitative characterization of T-cell

- repertoire in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2015;50(9):1227–1234.
32. Storek J, Joseph A, Dawson M a, Douek DC, Storer B, Maloney DG. Factors influencing T-lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transplantation* 2002;73(7):1154–8.
 33. Storek J, Geddes M, Khan F, et al. Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Semin Immunopathol* 2008;30(4):425–437.
 34. Storek J, Wells D, Dawson M a, Storer B, Maloney DG. Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2001;98(2):489–491.
 35. Glas AM, van Montfort EH, Storek J, et al. B-cell-autonomous somatic mutation deficit following bone marrow transplant. *Blood* 2000;96(3):1064–1069.
 36. Chklovskaja E, Nowbakht P, Nissen C, Gratwohl A, Bargetzi M, Wodnar-Filipowicz A. Reconstitution of dendritic and natural killer-cell subsets after allogeneic stem cell transplantation: Effects of endogenous flt3 ligand. *Blood* 2004;103(10):3860–3868.
 37. Dulphy N, Haas P, Busson M, et al. An unusual CD56(bright) CD16(low) NK cell subset dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol* 2008;181(3):2227–2237.
 38. Mohty M, Faucher C, Vey N, et al. Features of large granular lymphocytes (LGL) expansion following allogeneic stem cell transplantation: a long-term analysis. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK* 2002;16(10):2129–2133.
 39. Sabnani I, Zucker MJ, Tsang P, Palekar S. Clonal T-Large Granular Lymphocyte Proliferation in Solid Organ Transplant Recipients. *Transplant Proc* 2006;38(10):3437–3440.
 40. Sabnani I, Tsang P. Are clonal T-cell large granular lymphocytes to blame for unexplained haematological abnormalities? *Br J Haematol* 2007;136(1):30–37.
 41. Isobe T, Tanimoto TE, Nakaji G, et al. Autoimmune thrombocytopenia with clonal expansion of CD8-positive T cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2005;35(3):315–316.
 42. Qiu Z-Y, Tian G-Y, Zhang Z, Zhang Y-Q, Xu W, Li J-Y. Large granular lymphocytosis after transplantation. *Oncotarget* 2017;8(46):81697–81708.
 43. DOLSTRA H, PREIJERS F, KEMENADE EVDW, SCHATTENBERG A, GALAMA J, WITTE T DE. Expansion of CD8+CD57+ T cells after allogeneic BMT is related with a low incidence of relapse and with cytomegalovirus infection. *Br J Haematol* 1995;90(2):300–307.
 44. Mohty M, Faucher C, Gaugler B, et al. Large granular lymphocytes (LGL) following non-myeloablative allogeneic bone marrow transplantation: a case report. *Bone Marrow Transpl* 2001;28(12):1157–1160.
 45. Wang EC, Moss PA, Frodsham P, Lehner PJ, Bell JI, Borysiewicz LK.

-
- CD8^{high}CD57⁺ T lymphocytes in normal, healthy individuals are oligoclonal and respond to human cytomegalovirus. *J Immunol* 1995;155(10):5046–5056.
46. Kim D, Al-Dawsari G, Chang H, et al. Large granular lymphocytosis and its impact on long-term clinical outcomes following allo-SCT. *Bone Marrow Transpl* 2013;48(8):1104–1111.
47. Nann-Rütti S, Tzankov A, Cantoni N, et al. Large Granular Lymphocyte Expansion after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Is Associated with a Cytomegalovirus Reactivation and Shows an Indolent Outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;18(11):1765–1770.
48. Hsieh Y-C, Chang S-T, Huang W-T, Kuo S-Y, Chiang T-A, Chuang S-S. A comparative study of flow cytometric T cell receptor V β repertoire and T cell receptor gene rearrangement in the diagnosis of large granular lymphocytic lymphoproliferation. *Int J Lab Hematol* 2013;35(5):501–509.
49. Loughran Jr. TP, Zambello R, Ashley R, et al. Failure to detect Epstein-Barr virus DNA in peripheral blood mononuclear cells of most patients with large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 1993;81(10):2723–2727.
50. Lau LG, Tan LK, Salto-Tellez M, Koay ESC, Liu TC. T-cell post-transplant lymphoproliferative disorder after hematopoietic stem cell transplantation: another case and a review of the literature. *Bone Marrow Transplant* 2004;34(9):821–822.
51. Narumi H, Kojima K, Matsuo Y, et al. T-cell large granular lymphocytic leukemia occurring after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transpl* 2004;33(1):99–101.
52. Sajeva MR, Greco MM, Cascavilla N, et al. Effective autologous peripheral blood stem cell transplantation in plasma cell leukemia followed by T-large granular lymphocyte expansion: a case report. *Bone Marrow Transpl* 1996;18(1):225–227.
53. Maggi F, Ricci V, Bendinelli M, et al. Changes in CD8⁺57⁺ T lymphocyte expansions after autologous hematopoietic stem cell transplantation correlate with changes in torquetenovirus viremia (*Transplantation* (2008) 85, (1867)). *Transplantation* 2009;88(2):293.
54. Taylor AL, Marcus R, Bradley JA. Post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after solid organ transplantation. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2005;56(1 SPEC. ISS.):155–167.
55. Morecki S, Gelfand Y, Nagler A, et al. Immune reconstitution following allogeneic stem cell transplantation in recipients conditioned by low intensity vs myeloablative regimen. *Bone Marrow Transplant* 2001;28(3):243–249.
56. Loh E, Couch FJ, Hendricksen C, et al. Development of donor-derived prostate cancer in a recipient following orthotopic heart transplantation. *JAMA* 1997;277:133–137.
57. Au WY, Lam CCK, Lie AKW, Pang A, Kwong YL. T-cell large granular lymphocyte leukemia of donor origin after allogeneic bone marrow transplantation. *Am J Clin Pathol* 2003;120(4):626–630.
-

58. Hidalgo Lopez JE, Yabe M, Carballo-Zarate AA, et al. Donor-Derived T-Cell Large Granular Lymphocytic Leukemia in a Patient With Peripheral T-Cell Lymphoma. *J Natl Compr Canc Netw* 2016;14(8):939–44.
59. Loughran TP, Kadin ME, Starkebaum G, et al. Leukemia of large granular lymphocytes: Association with clonal chromosomal abnormalities and autoimmune neutropenia, thrombocytopenia, and hemolytic anemia. *Ann Intern Med* 1985;102(2):169–175.
60. Lamy T, Loughran TP. How I treat LGL leukemia. *Blood* 2011;117(10):2764–74.
61. Mohan SR, Maciejewski JP. Diagnosis and therapy of neutropenia in large granular lymphocyte leukemia. *Curr Opin Hematol* 2009;16(1):27–34.
62. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016;127(20):2375–90.
63. Zhang J, Xu X, Liu Y. Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity. *Cell Mol Immunol* 2004;1(3):186–92.
64. Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, et al. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest* 2001;107(3):351–62.
65. Yang J, Epling-Burnette PK, Painter JS, et al. Antigen activation and impaired Fas-induced death-inducing signaling complex formation in T-large-granular lymphocyte leukemia. *Blood* 2008;111(3):1610–6.
66. Leblanc F, Zhang D, Liu X, Loughran TP, Jr. Large granular lymphocyte leukemia: from dysregulated pathways to therapeutic targets. *Future Oncol* 2012;8(7):787–801.
67. Zhang R, Shah MV, Yang J, et al. Network model of survival signaling in large granular lymphocyte leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(42):16308–13.
68. Koskela HLM, Eldfors S, Ellonen P, et al. Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2012;366(20):1905–13.
69. Jerez A, Clemente MJ, Makishima H, et al. STAT3 mutations unify the pathogenesis of chronic lymphoproliferative disorders of NK cells and T cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 2012;120(15):3048–3058.
70. Rajala HLM, Eldfors S, Kuusanmäki H, et al. Discovery of somatic STAT5b mutations in large granular lymphocytic leukemia. *Blood* 2013;121(22):4541–50.
71. Lim CP, Cao X. Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Mol Biosyst* 2006;2(11):536–50.
72. Maritano D, Sugrue ML, Tininini S, et al. The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions. *Nat Immunol* 2004;5(4):401–9.
73. Ambrosio R, Fimiani G, Monfregola J, et al. The structure of human STAT5A and B genes reveals two regions of nearly identical sequence and an alternative tissue specific STAT5B promoter. *Gene* 2002;285(1–2):311–318.

-
74. Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998;334 (Pt 2)(Pt 2):297–314.
 75. Bromberg J, Darnell JE. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000;19(21):2468–2473.
 76. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009;9(11):798–809.
 77. Wen Z, Darnell JE. Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Res* 1997;25(11):2062–7.
 78. Kang K, Robinson GW, Hennighausen L. Comprehensive meta-analysis of Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) genomic binding patterns discerns cell-specific cis-regulatory modules. *BMC Genomics* 2013;14(1):4.
 79. Greenhalgh CJ, Hilton DJ. Negative regulation of cytokine signaling. *J Leukoc Biol* 2001;70(3):348–356.
 80. Takeda K, Noguchi K, Shi W, et al. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(8):3801–4.
 81. Takeda K, Kaisho T, Yoshida N, Takeda J, Kishimoto T, Akira S. Stat3 Activation Is Responsible for IL-6-Dependent T Cell Proliferation Through Preventing Apoptosis: Generation and Characterization of T Cell-Specific Stat3-Deficient Mice. *J Immunol*;161(9):.
 82. Akaishi H, Takeda K, Kaisho T, et al. Defective IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain expression in Stat3-deficient T lymphocytes. *Int Immunol* 1998;10(11):1747–51.
 83. Holland SM, DeLeo FR, Elloumi HZ, et al. *STAT3* Mutations in the Hyper-IgE Syndrome. *N Engl J Med* 2007;357(16):1608–1619.
 84. Mohr A, Fahrenkamp D, Rinis N, Müller-Newen G. Dominant-negative activity of the STAT3-Y705F mutant depends on the N-terminal domain. *Cell Commun Signal* 2013;1183.
 85. Yu H, Jove R. The STATs of cancer — new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 2004;4(2):97–105.
 86. Song JI, Grandis JR. STAT signaling in head and neck cancer. *Oncogene* 2000;19(21):2489–2495.
 87. Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, et al. Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor- mediated cell growth In vitro. *J Clin Invest* 1998;102(7):1385–92.
 88. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 1999;10(1):105–15.
 89. Garcia R, Bowman TL, Niu G, et al. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast
-

- carcinoma cells. *Oncogene* 2001;20(20):2499–2513.
90. Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* 2002;8(4):945–954.
 91. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* 2011;333(6046):1154–7.
 92. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* 2011;471(7339):467–472.
 93. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, et al. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999;98(3):295–303.
 94. Harris TJ, Grosso JF, Yen H-R, et al. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol* 2007;179(7):4313–7.
 95. Gaston JSH. Cytokines in arthritis the “big numbers” move centre stage. *Rheumatology* 2008;47(1):8–12.
 96. Nickoloff BJ, Griffiths CE, Barker JN. The role of adhesion molecules, chemotactic factors, and cytokines in inflammatory and neoplastic skin disease--1990 update. *J Invest Dermatol* 1990;94(6 Suppl):151S–157S.
 97. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 2007;13(10):1173–5.
 98. Schmechel S, Konrad A, Diegelmann J, et al. Linking genetic susceptibility to Crohn’s disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn’s disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14(2):204–212.
 99. Fasan A, Kern W, Grossmann V, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S. STAT3 mutations are highly specific for large granular lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2013;27(7):1598–1600.
 100. Ohgami RS, Ma L, Merker JD, Martinez B, Zehnder JL, Arber DA. STAT3 mutations are frequent in CD30+ T-cell lymphomas and T-cell large granular lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2013;27(11):2244–2247.
 101. Pilati C, Amessou M, Bihl MP, et al. Somatic mutations activating STAT3 in human inflammatory hepatocellular adenomas. *J Exp Med* 2011;208(7):1359–66.
 102. Couronné L, Scourzic L, Pilati C, et al. STAT3 mutations identified in human hematologic neoplasms induce myeloid malignancies in a mouse bone marrow transplantation model. *Haematologica* 2013;98(11):1748–52.
 103. Rajala HLM, Porkka K, Maciejewski JP, Loughran TP, Mustjoki S. Uncovering the pathogenesis of large granular lymphocytic leukemia--novel STAT3 and STAT5b mutations. *Ann Med* 2014;46(3):114–22.
 104. Rebouissou S, Amessou M, Couchy G, et al. Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature*
-

-
- 2009;457(7226):200–4.
105. Hu G, Witzig TE, Gupta M. A Novel Missense (M206K) STAT3 Mutation in Diffuse Large B Cell Lymphoma Deregulates STAT3 Signaling. *PLoS One* 2013;8(7):e67851.
 106. Zhang X, Yue P, Page BDG, et al. Orally bioavailable small-molecule inhibitor of transcription factor Stat3 regresses human breast and lung cancer xenografts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(24):9623–8.
 107. Hayakawa F, Sugimoto K, Harada Y, et al. A novel STAT inhibitor, OPB-31121, has a significant antitumor effect on leukemia with STAT-addictive oncokinasases. *Blood Cancer J* 2013;3(11):e166–e166.
 108. Souissi I, Najjar I, Ah-Koon L, et al. A STAT3-decoy oligonucleotide induces cell death in a human colorectal carcinoma cell line by blocking nuclear transfer of STAT3 and STAT3-bound NF- κ B. *BMC Cell Biol* 2011;12(1):14.
 109. Fortanier C, Kuentz M, Sutton L, et al. Healthy sibling donor anxiety and pain during bone marrow or peripheral blood stem cell harvesting for allogeneic transplantation: results of a randomised study. *Bone Marrow Transplant* 2002;29(2):145–9.
 110. Rowley SD, Donaldson G, Lilleby K, Bensinger WI, Appelbaum FR. Experiences of donors enrolled in a randomized study of allogeneic bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2001;97(9):2541–8.
 111. Ottinger HD, Beelen DW, Scheulen B, Schaefer UW, Grosse-Wilde H. Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood* 1996;88(7):2775–9.
 112. Martínez C, Urbano-ispizua A, Rovira M, Carreras E, Rozman C, Montserrat E. Immune Reconstitution Following Allogeneic Peripheral Blood Progenitor Cell Transplantation. *Leuk Lymphoma* 2000;37(5–6):535–542.
 113. Storek J, Dawson MA, Storer B, et al. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* 2001;97(11):3380–9.
 114. Pulsipher MA, Chitphakdithai P, Logan BR, et al. Lower risk for serious adverse events and no increased risk for cancer after PBSC vs BM donation. *Blood* 2014;123(23):3655–3663.
 115. Hopman RK, DiPersio JF. Advances in stem cell mobilization. *Blood Rev* 2014;28(1):31–40.
 116. Sezer O, Possinger K, Metzner B, et al. Optimal CD34(+) cell dose in autologous peripheral-blood stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2000;18(18):3319–20.
 117. Törlén J, Ringdén O, Le Rademacher J, et al. Low CD34 dose is associated with poor survival after reduced-intensity conditioning allogeneic transplantation for acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(9):1418–25.
 118. Sohn SK, Kim JG, Kim DH, Lee NY, Suh JS, Lee KB. Impact of transplanted CD34+ cell dose in allogeneic unmanipulated peripheral blood stem cell
-

- transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2003;31(11):967–972.
119. Mohty M, Bilger K, Jourdan E, et al. Higher doses of CD34+ peripheral blood stem cells are associated with increased mortality from chronic graft-versus-host disease after allogeneic HLA-identical sibling transplantation. *Leukemia* 2003;17(5):869–875.
 120. Zaucha JM, Gooley T, Bensinger WI, et al. CD34 cell dose in granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cell grafts affects engraftment kinetics and development of extensive chronic graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplantation. *Blood* 2001;98(12):3221–7.
 121. Czerw T, Labopin M, Schmid C, et al. High CD3+ and CD34+ peripheral blood stem cell grafts content is associated with increased risk of graft-versus-host disease without beneficial effect on disease control after reduced-intensity conditioning allogeneic transplantation from matched unrelated donors for acute myeloid leukemia — an analysis from the Acute Leukemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Oncotarget* 2016;7(19):27255–27266.
 122. Richa E, Papari M, Allen J, et al. Older Age But Not Donor Health Impairs Allogeneic Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) Peripheral Blood Stem Cell Mobilization. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15(11):1394–1399.
 123. Motlló C, Sancho J-M, Grífols J-R, et al. Mobilization and engraftment of peripheral blood stem cells in healthy related donors >55 years old. *Cytotherapy* 2014;16(3):406–11.
 124. Kröger N, Renges H, Krüger W, et al. A randomized comparison of once versus twice daily recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) for stem cell mobilization in healthy donors for allogeneic transplantation. *Br J Haematol* 2000;111(3):761–765.
 125. de la Rubia J, Arbona C, de Arriba F, et al. Analysis of factors associated with low peripheral blood progenitor cell collection in normal donors. *Transfusion* 2002;42(1):4–9.
 126. Bertani G, Santoleri L, Martino M, et al. Identification of hematopoietic progenitor cell donor characteristics predicting successful mobilization: results of an Italian multicenter study. *Transfusion* 2014;54(8):2028–2033.
 127. Gattillo S, Markt S, Rizzo L, et al. Plerixafor on demand in ten healthy family donors as a rescue strategy to achieve an adequate graft for stem cell transplantation. *Transfusion* 2015;55(8):1993–2000.
 128. Osma M, Ortuño F, de Arriba F, et al. Bone marrow steady-state CD34+/CD71– cell content is a predictive value of rG-CSF-mobilized CD34+ cells. *Bone Marrow Transplant* 1998;21(10):983–985.
 129. Hequet O. Hematopoietic stem and progenitor cell harvesting: technical advances and clinical utility. *J Blood Med* 2015;655.
 130. Wu F, Heng KK, Salleh RB, et al. Comparing peripheral blood stem cell collection using the COBE Spectra, Haemonetics MCS+, and Baxter Amicus.
-

-
- Transfus Apher Sci 2012;47(3):345–50.
131. Altuntas F, Kocyigit I, Ozturk A, et al. Comparison of the Fenwal Amicus and Fresenius Com.Tec cell separators for autologous peripheral blood progenitor cell collection. *Transfus Apher Sci* 2007;36(2):159–67.
 132. Reinhardt P, Brauninger S, Bialleck H, et al. Automatic interface-controlled apheresis collection of stem/progenitor cells: results from an autologous donor validation trial of a novel stem cell apheresis device. *Transfusion* 2011;51(6):1321–1330.
 133. Flommersfeld S, Bakchoul T, Bein G, Wachtel A, Loechelt C, Sachs UJ. A single center comparison between three different apheresis systems for autologous and allogeneic stem cell collections. *Transfus Apher Sci* 2013;49(3):428–33.
 134. Ikeda K, Ohto H, Kanno T, et al. Peripheral blood progenitor cell collection by two programs for autologous and allogeneic transplantation. *Transfusion* 2014;54(5):1235–1242.
 135. Cherqaoui B, Rouel N, Auvrignon A, et al. Peripheral blood stem cell collection in low-weight children: retrospective comparison of two apheresis devices. *Transfusion* 2014;54(5):1371–1378.
 136. Brauninger S, Bialleck H, Thorausch K, Felt T, Seifried E, Bonig H. Allogeneic donor peripheral blood “stem cell” apheresis: prospective comparison of two apheresis systems. *Transfusion* 2012;52(5):1137–1145.
 137. Lozano ML, Lopez V, Castilla-Llorente C, et al. Mononuclear cell collection for extracorporeal photochemotherapy: Prospective study comparing two apheresis systems. *Bone Marrow Transplant* [Epub ahead of print].
 138. Martha Rae combs, Gregory Denomme, Brenda J. Grossman, N. Rebecca Haley, Teresa Harris, Betsy W. Jett, Regina M. Leger, Jeanne V. Linden, Janice G.McFarland, James T. Perkins, SusanD. Roseff, Joseph Sweeney DJT. *Technical Manual of the American Association of Blood Banks*. 15th Edition. 139-161 p.
 139. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med* 2001;344(3):175–81.
 140. Theilgaard-Mönch K, Raaschou-Jensen K, Andersen H, et al. Single leukapheresis products collected from healthy donors after the administration of granulocyte colony-stimulating factor contain ten-fold higher numbers of long-term reconstituting hematopoietic progenitor cells than conventional bone marrow allograft. *Bone Marrow Transplant* 1999;23(3):243–9.
 141. Ringdén O, Barrett AJ, Zhang M-J, et al. Decreased treatment failure in recipients of HLA-identical bone marrow or peripheral blood stem cell transplants with high CD34 cell doses. *Br J Haematol* 2003;121(6):874–85.
 142. Nakamura R, Auayporn N, Smith DD, et al. Impact of graft cell dose on transplant outcomes following unrelated donor allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: higher CD34+ cell doses are associated with decreased relapse rates. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14(4):449–57.
-

143. Cao TM, Shizuru JA, Wong RM, et al. Engraftment and survival following reduced-intensity allogeneic peripheral blood hematopoietic cell transplantation is affected by CD8+ T-cell dose. *Blood* 2005;105(6):2300–6.
144. Törlén J, Ringdén O, Le Rademacher J, et al. Low CD34 dose is associated with poor survival after reduced-intensity conditioning allogeneic transplantation for acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(9):1418–25.
145. Pulsipher MA, Chitphakdithai P, Logan BR, et al. Donor, recipient, and transplant characteristics as risk factors after unrelated donor PBSC transplantation: beneficial effects of higher CD34+ cell dose. *Blood* 2009;114(13):2606–16.
146. Przepiorka D, Smith TL, Folloder J, et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation. *Blood* 1999;94(4):1465–70.
147. Gorin N-C, Labopin M, Boiron J-M, et al. Results of genotypical hemopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning for acute myelocytic leukemia: higher doses of stem cells infused benefit patients receiving transplants in second remission or beyond--the Acute Leukemia W. *J Clin Oncol* 2006;24(24):3959–66.
148. Perez-Simon JA, Diez-Campelo M, Martino R, et al. Impact of CD34+ cell dose on the outcome of patients undergoing reduced-intensity-conditioning allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2003;102(3):1108–13.
149. Czerw T, Labopin M, Schmid C, et al. High CD3+ and CD34+ peripheral blood stem cell grafts content is associated with increased risk of graft-versus-host disease without beneficial effect on disease control after reduced-intensity conditioning allogeneic transplantation from matched unrelated. *Oncotarget* 2016;7(19):27255–66.
150. Barge RM, Brouwer RE, Beersma MF, et al. Comparison of allogeneic T cell-depleted peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation: effect of stem cell source on short- and long-term outcome. *Bone Marrow Transplant* 2001;27(10):1053–8.
151. Chakraverty R, Robinson S, Peggs K, et al. Excessive T cell depletion of peripheral blood stem cells has an adverse effect upon outcome following allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28(9):827–34.
152. Kreiter S, Winkelmann N, Schneider PM, et al. Failure of sustained engraftment after non-myeloablative conditioning with low-dose TBI and T cell-reduced allogeneic peripheral stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28(2):157–61.
153. Cao TM, Wong RM, Sheehan K, et al. CD34, CD4, and CD8 cell doses do not influence engraftment, graft-versus-host disease, or survival following myeloablative human leukocyte antigen-identical peripheral blood allografting for hematologic malignancies. *Exp Hematol* 2005;33(3):279–85.
154. Waller EK, Logan BR, Harris WAC, et al. Improved survival after

-
- transplantation of more donor plasmacytoid dendritic or naïve T cells from unrelated-donor marrow grafts: results from BMTCTN 0201. *J Clin Oncol* 2014;32(22):2365–72.
155. Ho VT, Kim HT, Li S, et al. Partial CD8⁺ T-cell depletion of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation is insufficient to prevent graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2004;34(11):987–94.
 156. Reshef R, Huffman AP, Gao A, et al. High Graft CD8 Cell Dose Predicts Improved Survival and Enables Better Donor Selection in Allogeneic Stem-Cell Transplantation With Reduced-Intensity Conditioning. *J Clin Oncol* 2015;33(21):2392–8.
 157. Moscardó F, Sanz J, Carbonell F, et al. Effect of CD8⁺ cell content on umbilical cord blood transplantation in adults with hematological malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(11):1744–50.
 158. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol* 2013;31:227–58.
 159. Horowitz A, Strauss-Albee DM, Leipold M, et al. Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry. *Sci Transl Med* 2013;5(208):208ra145.
 160. Strauss-Albee DM, Fukuyama J, Liang EC, et al. Human NK cell repertoire diversity reflects immune experience and correlates with viral susceptibility. *Sci Transl Med* 2015;7(297):297ra115.
 161. Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcR3-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 1989;143(10):3183–91.
 162. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* 2001;22(11):633–640.
 163. Mavilio D, Lombardo G, Benjamin J, et al. Characterization of CD56⁻/CD16⁺ natural killer (NK) cells: A highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102(8):2886–2891.
 164. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood* 2008;112(3):461–469.
 165. Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. CD56^{bright} natural killer (NK) cells: An important NK cell subset. *Immunology* 2009;126(4):458–465.
 166. Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, et al. CD56^{bright} cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56^{dim} NK cells. *Eur J Immunol* 2001;31(10):3121–3126.
 167. Lanier LL, L L. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998;16(1):359–93.
 168. Vitale M, Zimmer J, Castriconi R, et al. Analysis of natural killer cells in TAP2-deficient patients: expression of functional triggering receptors and evidence for the existence of inhibitory receptor(s) that prevent lysis of normal autologous cells. *Blood* 2002;99(5):1723–1729.
-

169. Wendt K, Wilk E, Buyny S, Schmidt RE, Jacobs R. Interleukin-21 differentially affects human natural killer cell subsets. *Immunology* 2007;122(4):486–95.
170. Campbell JJ, Qin S, Unutmaz D, et al. Unique Subpopulations of CD56+ NK and NK-T Peripheral Blood Lymphocytes Identified by Chemokine Receptor Expression Repertoire. *J Immunol* 2001;166(11):6477–6482.
171. Sedlmayr P, Schallhammer L, Hammer A, Wilders-Truschnig M, Wintersteiger R, Dohr G. Differential phenotypic properties of human peripheral blood CD56dim+ and CD56bright+ natural killer cell subpopulations. *Int Arch Allergy Immunol* 1996;110(4):308–13.
172. Anumanthan A, Bensussan A, Boumsell L, et al. Cloning of BY55, a novel Ig superfamily member expressed on NK cells, CTL, and intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol* 1998;161(6):2780–90.
173. Solomon KR, Chan M, Finberg RW. Expression of GPI-Anchored Complement Regulatory Proteins CD55 and CD59 Differentiates Two Subpopulations of Human CD56+CD3- Lymphocytes (NK Cells). *Cell Immunol* 1995;165(2):294–301.
174. Hanna J, Bechtel P, Zhai Y, Youssef F, McLachlan K, Mandelboim O. Novel insights on human NK cells’ immunological modalities revealed by gene expression profiling. *J Immunol* 2004;173(11):6547–63.
175. Wendt K, Wilk E, Buyny S, Buer J, Schmidt RE, Jacobs R. Gene and protein characteristics reflect functional diversity of CD56dim and CD56bright NK cells. *J Leukoc Biol* 2006;80(6):1529–41.
176. Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, et al. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* 1999;162(8):4511–20.
177. Ferlazzo G, Thomas D, Lin S-L, et al. The Abundant NK Cells in Human Secondary Lymphoid Tissues Require Activation to Express Killer Cell Ig-Like Receptors and Become Cytolytic. *J Immunol* 2004;172(3):1455–1462.
178. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003;101(8):3052–7.
179. Ferlazzo G, Munz C. NK Cell Compartments and Their Activation by Dendritic Cells. *J Immunol* 2004;172(3):1333–1339.
180. Vitale M, Bottino C, Sivori S, et al. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 1998;187(12):2065–72.
181. Vitale M, Chiesa MD, Carlomagno S, et al. The small subset of CD56brightCD16- natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon- γ production upon interaction with dendritic cells. *Eur J Immunol* 2004;34(6):1715–1722.

-
182. Dalbeth N, Gundle R, Davies RJO, Lee YCG, McMichael AJ, Callan MFC. CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J Immunol* 2004;173(10):6418–26.
 183. Andre P, Spertini O, Guia S, et al. Modification of P-selectin glycoprotein ligand-1 with a natural killer cell-restricted sulfated lactosamine creates an alternate ligand for L-selectin. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97(7):3400–3405.
 184. Chan A, Hong D-L, Atzberger A, et al. CD56bright Human NK Cells Differentiate into CD56dim Cells: Role of Contact with Peripheral Fibroblasts. *J Immunol* 2007;179(1):89–94.
 185. Romagnani C, Juelke K, Falco M, et al. CD56brightCD16- Killer Ig-Like Receptor- NK Cells Display Longer Telomeres and Acquire Features of CD56dim NK Cells upon Activation. *J Immunol* 2007;178(8):4947–4955.
 186. Ouyang Q, Baerlocher G, Vulto I, Lansdorp PM. Telomere length in human natural killer cell subsets. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1106(1):240–52.
 187. Carson W, Caligiuri M. Natural Killer Cell Subsets and Development. *Methods* 1996;9(2):327–343.
 188. Zimmer J, Bausinger H, Andrès E, et al. Phenotypic Studies of Natural Killer Cell Subsets in Human Transporter Associated with Antigen Processing Deficiency. *PLoS One* 2007;2(10):e1033.
 189. Villa-Forte A, de la Salle H, Fricker D, Hentges F, Zimmer J. HLA class I deficiency syndrome mimicking Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 2008;58(8):2579–82.
 190. Cac NN, Ballas ZK. Recalcitrant warts, associated with natural killer cell dysfunction, treated with systemic IFN-alpha. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118(2):526–8.
 191. Saraste M, Irjala H, Airas L. Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Neurol Sci* 2007;28(3):121–126.
 192. Bielekova B, Richert N, Howard T, et al. Humanized anti-CD25 (daclizumab) inhibits disease activity in multiple sclerosis patients failing to respond to interferon beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(23):8705–8.
 193. Bielekova B, Catalfamo M, Reichert-Scriver S, et al. Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(15):5941–6.
 194. Li Z, Lim WK, Mahesh SP, Liu B, Nussenblatt RB. Cutting edge: in vivo blockade of human IL-2 receptor induces expansion of CD56(bright) regulatory NK cells in patients with active uveitis. *J Immunol* 2005;174(9):5187–91.
 195. Shigeru S, Akitoshi N, Subaru M-H, et al. The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy. *J Reprod Immunol* 2008;77(1):14–22.
-

196. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008;9(5):503–510.
197. Kubo T, Sato K, Kobayashi D, et al. A case of HHV-6 associated acute necrotizing encephalopathy with increase of CD56^{bright} NK cells. *Scand J Infect Dis* 2006;38(11–12):1122–1125.
198. Shibata F, Toma T, Wada T, et al. Skin infiltration of CD56^{bright} CD16⁻ natural killer cells in a case of X-SCID with Omenn syndrome-like manifestations. *Eur J Haematol* 2007;79(1):81–85.
199. Golden-Mason L, Madrigal-Estebas L, McGrath E, et al. Altered natural killer cell subset distributions in resolved and persistent hepatitis C virus infection following single source exposure. *Gut* 2008;57(8):1121–8.
200. Barcelos W, Sathler-Avelar R, Martins-Filho OA, et al. Natural Killer Cell Subpopulations in Putative Resistant Individuals and Patients with Active Mycobacterium tuberculosis Infection. *Scand J Immunol* 2008;68(1):92–102.
201. Schepis D, Gunnarsson I, Eloranta M-L, et al. Increased proportion of CD56^{bright} natural killer cells in active and inactive systemic lupus erythematosus. *Immunology* 2009;126(1):140–6.
202. Kusumi M, Yamashita T, Fujii T, Nagamatsu T, Kozuma S, Taketani Y. Expression patterns of lectin-like natural killer receptors, inhibitory CD94/NKG2A, and activating CD94/NKG2C on decidual CD56^{bright} natural killer cells differ from those on peripheral CD56^{dim} natural killer cells. *J Reprod Immunol* 2006;70(1–2):33–42.
203. Gumá M, Angulo A, Vilches C, Gómez-Lozano N, Malats N, López-Botet M. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 2004;104(12):3664–71.
204. Gumá M, Cabrera C, Erkizia I, et al. Human Cytomegalovirus Infection Is Associated with Increased Proportions of NK Cells That Express the CD94/NKG2C Receptor in Aviremic HIV-1-Positive Patients. *J Infect Dis* 2006;194(1):38–41.
205. Mela CM, Burton CT, Imami N, et al. Switch from inhibitory to activating Nkg2 receptor expression in Hiv-1 infection: lack of reversion with highly active antiretroviral therapy. *Aids* 2005;19(16):1761–1769.
206. Ottaviani C, Nasorri F, Bedini C, de Pità O, Girolomoni G, Cavani A. CD56^{bright}CD16⁻ NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. *Eur J Immunol* 2006;36(1):118–128.
207. Pridgeon C, Lennon GP, Pazmany L, Thompson RN, Christmas SE, Moots RJ. Natural killer cells in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients exhibit a CD56^{bright}, CD94^{bright}, CD158^{negative} phenotype. *Rheumatology* 2003;42(7):870–878.
208. Katchar K, Söderström K, Wahlstrom J, Eklund A, Grunewald J. Characterisation of natural killer cells and CD56⁺ T-cells in sarcoidosis patients. *Eur Respir J* 2005;26(1):77–85.

-
209. Hak Ł, Myśliwska J, Więckiewicz J, et al. NK cell compartment in patients with coronary heart disease. *Immun Ageing* 2007;4(1):3.
 210. Scordamaglia F, Balsamo M, Scordamaglia A, et al. Perturbations of natural killer cell regulatory functions in respiratory allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121(2):479–85.
 211. Villanueva J, Lee S, Giannini EH, et al. Natural killer cell dysfunction is a distinguishing feature of systemic onset juvenile rheumatoid arthritis and macrophage activation syndrome. *Arthritis Res Ther* 2005;7(1):R30-7.
 212. Kariminia A, Ivison S, Ng B, et al. CD56bright natural killer regulatory cells in filgrastim primed donor blood or marrow products regulate chronic graft-versus-host disease: The Canadian blood and marrow transplant group randomized 0601 study results. *Haematologica* 2017;102(11):1936–1946.
 213. Chakrabarti S, Mackinnon S, Chopra R, et al. High incidence of cytomegalovirus infection after nonmyeloablative stem cell transplantation: Potential role of Campath-1H in delaying immune reconstitution. *Blood* 2002;99(12):4357–4363.
 214. Savani BN, Mielke S, Adams S, et al. Rapid natural killer cell recovery determines outcome after T-cell-depleted HLA-identical stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias but not with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2007;21(10):2145–52.
 215. Chen T, Guo J, Yang M, et al. Cyclosporin A impairs dendritic cell migration by regulating chemokine receptor expression and inhibiting cyclooxygenase-2 expression. *Blood* 2004;103(2):413–421.
 216. Storek J, Ferrara S, Ku N, Giorgi J V, Champlin RE, Saxon A. B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? *Bone Marrow Transpl* 1993;12(4):387–398.
 217. Mackall CL, Bare C V, Granger LA, Sharrow SO, Titus JA, Gress RE. Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J Immunol*;156(12):.
 218. Wolniak KL, Goolsby CL, Chen YH, et al. Expansion of a clonal CD8+CD57+ large granular lymphocyte population after autologous stem cell transplant in multiple myeloma. *Am J Clin Pathol* 2013;139(2):231–241.
 219. Brouet J-C, Sasportes M, Flandrin G, Preud'Homme J-L, Seligmann M. Chronic Lymphocytic Leukaemia of T-cell origin, Immunological and clinical evaluation of eleven patients. *Lancet* 1975;306(7941):890–893.
 220. Watters RJ, Loughran TP. Diagnosing large granular lymphocyte leukemia is bloody difficult. *Leukemia and Lymphoma* 2013;54(2):438–439.
 221. Koskela HLM, Eldfors S, Ellonen P, et al. Somatic *STAT3* Mutations in Large Granular Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2012;366(20):1905–1913.
 222. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. In: *Bone marrow transplantation*. 1995. p825–828.
 223. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health
-

- consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11(12):945–56.
224. Boeckh M, Bowden R a, Goodrich JM, Pettinger M, Meyers JD. Cytomegalovirus antigen detection in peripheral blood leukocytes after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1992;80(5):1358–1364.
225. Robin M, Porcher R, De Castro Araujo R, et al. Risk Factors for Late Infections after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation from a Matched Related Donor. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13(11):1304–1312.
226. Servais S, Menten-Dedoyart C, Beguin Y, et al. Impact of pre-transplant anti-T cell globulin (ATG) on immune recovery after myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *PLoS One*;10(6):.
227. Hahn T, Sucheston-Campbell LE, Preus L, et al. Establishment of Definitions and Review Process for Consistent Adjudication of Cause-specific Mortality after Allogeneic Unrelated-donor Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21(9):1679–1686.
228. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2008. 326 p.
229. Bateau B, Rey J, Hamidou M, et al. Analysis of a French cohort of patients with large granular lymphocyte leukemia: A report on 229 cases. *Haematologica* 2010;95(9):1534–1541.
230. Jerez A, Clemente MJ, Makishima H, et al. STAT3 mutations indicate the presence of subclinical T-cell clones in a subset of aplastic anemia and myelodysplastic syndrome patients. *Blood* 2013;122(14):2453–2459.
231. Saitoh H, Hirokawa M, Fujishima N, et al. The presence and longevity of peripherally expanded donor-derived TCRalpha+ mature T lymphocyte clones after allogeneic bone marrow transplantation for adult myeloid leukemias. *Leukemia* 2003;17(8):1626–1635.
232. Hirokawa M, Horiuchi T, Kawabata Y, Kitabayashi A, Miura AB. Reconstitution of gammadelta T cell repertoire diversity after human allogeneic hematopoietic cell transplantation and the role of peripheral expansion of mature T cell population in the graft. *Bone Marrow Transplant* 2000;26(2):177–85.
233. Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990;76(12):2462–2465.
234. Claret EJ, Alyea EP, Orsini E, et al. Characterization of T cell repertoire in patients with graft-versus-leukemia after donor lymphocyte infusion. *J Clin Invest* 1997;100(4):855–66.
235. Schmid C, Labopin M, Nagler A, et al. Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party. *J Clin Oncol* 2007;25(31):4938–45.

-
236. Kollgaard T, Petersen SL, Hadrup SR, et al. Evidence for involvement of clonally expanded CD8⁺ T cells in anticancer immune responses in CLL patients following nonmyeloablative conditioning and hematopoietic cell transplantation. *Leukemia* 2005;19(12):2273–2280.
 237. Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R, Thomas ED. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: Contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med* 1981;304(25):1529–1533.
 238. Lee SJ, Logan B, Westervelt P, et al. Comparison of Patient-Reported Outcomes in 5-Year Survivors Who Received Bone Marrow vs Peripheral Blood Unrelated Donor Transplantation: Long-term Follow-up of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2016;2(12):1583–1589.
 239. Goldman J. Peripheral blood stem cells for allografting. *Blood* 1995;85(6):1413–5.
 240. Dhédin N, Prébet T, De Latour RP, et al. Extensive chronic GVHD is associated with donor blood CD34⁺ cell count after G-CSF mobilization in non-myeloablative allogeneic PBSC transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2012;47(12):1564–8.
 241. Vasu S, Geyer S, Bingman A, et al. Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Mobilized Allografts Contain Activated Immune Cell Subsets Associated with Risk of Acute and Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016;22(4):658–668.
 242. Gallo S, Woolfrey AE, Burroughs LM, et al. Marrow grafts from HLA-identical siblings for severe aplastic anemia: does limiting the number of transplanted marrow cells reduce the risk of chronic GvHD? *Bone Marrow Transplant* 2016;51(12):1573–1578.
 243. Ding L, Zhu H, Yang Y, et al. The absolute number of regulatory T cells in unmanipulated peripheral blood grafts predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease post haplo-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk Res* 2017;56:13–20.
 244. Vela-Ojeda J, García-Ruiz Esparza MA, Reyes-Maldonado E, et al. Clinical relevance of NK, NKT, and dendritic cell dose in patients receiving G-CSF-mobilized peripheral blood allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2006;85(2):113–20.
 245. Couban S, Aljurf M, Lachance S, et al. Filgrastim-Stimulated Bone Marrow Compared with Filgrastim-Mobilized Peripheral Blood in Myeloablative Sibling Allografting for Patients with Hematologic Malignancies: A Randomized Canadian Blood and Marrow Transplant Group Study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016;22(8):1410–1415.
 246. Alamo AL, Melnick SJ. Clinical application of four and five-color flow cytometry lymphocyte subset immunophenotyping. *Cytometry* 2000;42(6):363–70.
 247. Stem Cell Trialists' Collaborative Group. Allogeneic peripheral blood stem-cell compared with bone marrow transplantation in the management of hematologic malignancies: an individual patient data meta-analysis of nine randomized trials.
-

- J Clin Oncol 2005;23(22):5074–87.
248. Delia M, Pastore D, Mestice A, et al. Outcome of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation by donor graft CD3+/Tregs ratio: a single-center experience. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19(3):495–9.
 249. Nachbaur D, Kircher B. Dendritic cells in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 2005;46(10):1387–96.
 250. Kariminia A, Holtan SG, Ivison S, et al. Heterogeneity of chronic graft-versus-host disease biomarkers: association with CXCL10 and CXCR3+ NK cells. *Blood* 2016;127(24):3082–91.
 251. Wolff D, Greinix H, Lee SJ, et al. Biomarkers in chronic graft-versus-host disease: quo vadis? *Bone Marrow Transplant* 2018;53(7):832–837.
 252. Ferlazzo G, Münz C. NK Cell Compartments and Their Activation by Dendritic Cells. *J Immunol* 2004;172(3):1333–1339.
 253. Meropol NJ, Porter M, Blumenson LE, et al. Daily subcutaneous injection of low-dose interleukin 2 expands natural killer cells in vivo without significant toxicity. *Clin Cancer Res* 1996;2(4):669–77.
 254. Bielekova B, Catalfamo M, Reichert-Scriver S, et al. Regulatory CD56bright natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2R α -targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103(15):5941–5946.
 255. Przepiorcka D, Kernan N a, Ippoliti C, et al. Daclizumab, a humanized anti-interleukin-2 receptor alpha chain antibody, for treatment of acute graft-versus-host disease. *Blood* 2000;95(1):83–89.
 256. Bordigoni P, Dimicoli S, Clement L, et al. Daclizumab, an efficient treatment for steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 2006;135(3):382–385.
 257. Bashey A, Zhang X, Sizemore CA, et al. T-cell-replete HLA-haploidentical hematopoietic transplantation for hematologic malignancies using post-transplantation cyclophosphamide results in outcomes equivalent to those of contemporaneous HLA-matched related and unrelated donor transplantation. *J Clin Oncol* 2013;31(10):1310–6.
 258. Bacigalupo A, Lamparelli T, Barisione G, et al. Thymoglobulin prevents chronic graft-versus-host disease, chronic lung dysfunction, and late transplant-related mortality: long-term follow-up of a randomized trial in patients undergoing unrelated donor transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12(5):560–5.
 259. Yakoub-Agha I, Saule P, Depil S, et al. Comparative analysis of naïve and memory CD4+ and CD8+ T-cell subsets in bone marrow and G-CSF-mobilized peripheral blood stem cell allografts: impact of donor characteristics. *Exp Hematol* 2007;35(6):861–71.
 260. Levine JE, Braun TM, Harris AC, et al. A prognostic score for acute graft-versus-host disease based on biomarkers: a multicentre study. *Lancet Haematol* 2015;2(1):e21–e29.
-

-
261. Devine SM, Vij R, Rettig M, et al. Rapid mobilization of functional donor hematopoietic cells without G-CSF using AMD3100, an antagonist of the CXCR4/SDF-1 interaction. *Blood* 2008;112(4):990–8.
 262. Schroeder MA, Rettig MP, Lopez S, et al. Mobilization of allogeneic peripheral blood stem cell donors with intravenous plerixafor mobilizes a unique graft. *Blood* 2017;129(19):2680–2692.
 263. Wong PPC, Kariminia A, Jones D, et al. Plerixafor effectively mobilizes CD56bright NK cells in blood, providing an allograft predicted to protect against GVHD. *Blood* 2018;131(25):2863–2866.

APÉNDICE:

Producción científica en relación al trabajo de Tesis

7. APÉNDICE: Producción científica en relación al trabajo de Tesis

7.1. Artículos Científicos

- Muñoz-Ballester J, Chen-Liang TH, Hurtado AM, Heras I, de Arriba F, García-Malo MD, Iniesta P, Lozano ML, Nieto JB, Ortuño FJ, OsmaMdel M, Padilla J, Teruel-Montoya R, Vicente V, Castilla-Llorente C, Jerez A. Persistent cytotoxic T lymphocyte expansions after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: kinetics, clinical impact and absence of STAT3 mutations. *Br J Haematol.* 2016 Mar;172(6):937-46. doi: 10.1111/bjh.13917. Epub 2016 Jan 5.

7.2. Comunicaciones a Congresos

- Muñoz-Ballester J, Chen-Liang TH, Hurtado AM, Iniesta P, García-Malo MD, Nieto JB, Osma MM, de Arriba F, Heras I, Ortuño FJ, Vicente V, Castilla-Llorente C, Jerez A. Expansiones persistentes de linfocitos T citotóxicos tras trasplante alogénico: mayor frecuencia en intensidad reducida, relación con eventos postrasplante temprano y ausencia de mutaciones en STAT3. LVI Congreso Nacional de la SEHH- XXX Congreso Nacional de la SETH. Del 8 de noviembre 2014, Madrid.
- Muñoz-Ballester J, Castilla-Llorente C, Chen-Liang TH, Hurtado AM, Iniesta P, García-Malo MD, Nieto JB, Osma MM, de Arriba F, Heras I,Ortuño FJ, Vicente V, Jerez A. Cytotoxic T lymphocyte expansions after allogeneic hematopoietic transplantation: absence of STAT3 mutation and correlation with reduced-intensity conditioning and early post-transplant events Oral session: 41st EBMT 2015 Congress. Estambul, Trukía. Del 22 al 25 de marzo de 2015

- Muñoz-Ballester Julia, Chen-Liang Tzu Hua, Hurtado Ana María, Iniesta Pastora, García-Malo María Dolores, Nieto José Bartolomé, Padilla José, Teruel Montoya Raul, Osma Maria del Mar, Lozano María Luisa, de Arriba Felipe, Ortuño Francisco José, Heras Inmaculada, Vicente Vicente, Castilla-Llorente Cristina and Jerez Andres. Persistent Cytotoxic T Lymphocyte Expansions after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Kinetics, Clinical Impact and Absence of STAT3 Mutations. Oral and Poster Abstracts. 57th ASH Annual Meeting and Exposition. Orlando FL, Del 5 al 8 de diciembre de 2015.

- Muñoz-Ballester Julia, Chen-Liang Tzu-Hua, Hurtado Ana María, Iniesta Pastora, Nieto José Bartolomé, López-Godino Oriana, de Arriba Felipe, Heras Inmaculada, Vicente Vicente, Castilla-Llorente Cristina, Jerez Andrés. Ausencia de impacto pronóstico de los valores de ferritina sérica tras estratificación según niveles de vsg y status de respuesta pre-trasplante alogénico. Relación de la sobrecarga férrica con el patrón de reconstitución inmune y el desarrollo de infecciones fúngicas tras trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Póster comentado: LVII Congreso Nacional de la SEHH XXXI Congreso Nacional de la SETH. Valencia. Del 22 al 24 de octubre de 2015.

- Muñoz-Ballester Julia, Chen-Liang Tzu-Hua, Hurtado Ana María, Iniesta Pastora, Nieto José Bartolomé, López-Godino Oriana, de Arriba Felipe, Heras Inmaculada, Vicente Vicente, Castilla-Llorente Cristina, Jerez Andrés. Relación de la sobrecarga férrica con el patrón de reconstitución inmune y el desarrollo de infecciones fúngicas tras trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Póster comentado: LVII Congreso Nacional de la SEHH XXXI Congreso Nacional de la SETH. Valencia. Del 22 al 24 de octubre de 2015.

- Muñoz-Ballester J, Chen Liang TH, Hurtado AM, Santos Rodríguez M, Serna M.ªJ, Heras I, Iniesta P, Nieto JB, De Arriba F, Ortuño FJ, López Godino O, Revilla N, Vicente V, Castilla Llorente C, Lozano M.ªL, Jerez A. Una ratio CD3+/CD19+ elevada en el inóculo se asocia al desarrollo de enfermedad injerto

contra receptor aguda grados III-IV en el trasplante alogénico de intensidad reducida. Póster comentado: LVIII congreso nacional SEHH / XXXII congreso SETH. Del 20 al 22 de octubre 2016. Santiago de Compostela

- Muñoz-Ballester J., Chen Liang T.H., Santos Rodríguez M., Hurtado A.M., Nieto J.B., De Arriba F., Revilla N., García Malo M.D., Ortuño F., López Godino O., Iniesta P., Vicente V., Heras I., Castilla Llorente C., Lozano M.L., Jerez A. Impacto de la composición linfocitaria del inóculo en la reconstitución inmune tras trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica. Póster comentado: LIX Congreso Nacional de la SEHH XXXIII congreso nacional de la SETH. Del 26 al 28 de octubre de 2017. Málaga.

