

~~F. 543~~

BID T 4012

Hospital Universitario La Fe, Valencia  
Servicio de Hematología y Hemoterapia  
Sección de Hematología Clínica

"AUTOINJERTO DE CELULAS PRECURSORAS HEMATOPOYETICAS  
DE SANGRE PERIFERICA EN EL TRATAMIENTO DE PACIENTES  
CON NEOPLASIAS HEMATOLOGICAS"

JAVIER DE LA RUBIA COMOS  
CURSO ACADEMICO 1990-91  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD LITERARIA DE VALENCIA

UMI Number: U607457

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607457

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346

FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO MEDICINA

Autor JAVIER DE LA RUBIA COMOS

Título completo de la tesis

AUTOINJERTO DE CELULAS PRECURSORAS HEMATOPOYETICAS  
DE SANGRE PERIFERICA EN EL TRATAMIENTO DE  
PACIENTES CON NEOPLASIAS HEMATOLOGICAS.



Calificación APTO CUM LAUDE

Fecha de lectura 27. SEPTIEMBRE. 1991

Tribunal (Nombre y apellidos de los componentes)

- D. JAVIER GARCIA-CONDE BRU
- D. MANUEL RIBAS MUNDO
- ✓ D. ANTONIO LÓPEZ BARRASCA
- D. JOAQUIN DIAZ MEDAULLA
- D. ANTONIO BRUGAROLAS MASLLORENS.

Director de la tesis

- D. MIGUEL ANGEL SANZ ALONSO

Dirección particular y teléf. del autor.

~~VERBA~~

CIRILO AMOROS, 10-1 ; 46004- VALENCIA. ESPAÑA

Tlfno: (96) 3-51-27-92



R 50.193

D. Miguel Angel Sanz Alonso, Doctor en Medicina, Jefe de la Sección de Hematología Clínica del Hospital La Fe de Valencia y Profesor Asociado Médico de la Universidad de Valencia,

**CERTIFICA:**

Que D. Javier de la Rubia Comos ha realizado personalmente y bajo su dirección el trabajo, para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía, titulado:

"Autoinjerto de células precursoras hematopoyéticas de sangre periférica en el tratamiento de pacientes con neoplasias hematológicas"

Y para que así conste, a efectos académicos, se expide el presente certificado en el lugar y fecha indicados.

Valencia, 18 de junio de 1991



Fdo.: Dr. M.A. Sanz Alonso

A Miguel A. Sanz. De él he recibido la orientación precisa en todo momento. En su consejo y ayuda he encontrado el apoyo necesario para la realización de esta Tesis.

A M<sup>a</sup> Luisa Marty por la confianza y comprensión que me ha ofrecido.

A todos mis compañeros del Servicio de Hematología cuyo ejemplo y estímulo constante han sido mi mejor ayuda.

A los ATS de la sección de citoaféresis por su trabajo y profesionalidad.

Al Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana, especialmente a la Dr<sup>a</sup> Angeles Soler y a la Dr<sup>a</sup> Neli Carpio por su colaboración en la realización del estudio.

**A mis padres**

**A mis hermanos**

**A Celia**



**A María, Madre de la Sabiduría**

Sólo existe un motivo para trabajar intensamente sin buscar ni vanagloria ni compensación económica: Vocación.

J. de la Rubia Pacheco.

**INDICE  
Y  
GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

---

	<u>Página</u>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>MOTIVACION DE LA TESIS</b>	<b>2</b>
<b>AUTOTRANSPLANTE A PARTIR DE CELULAS PROGENITORAS DE SANGRE PERIFERICA</b>	<b>4</b>
<b>IDENTIFICACION DE PECURSORES CIRCULANTES</b>	<b>7</b>
<b>RECOGIDA DE CELULAS PROGENITORAS</b>	<b>8</b>
Métodos para incrementar el rendimiento de CPSP	
Quimioterápicos	10
Modificadores de la respuesta biológica	12
<b>RECOLECCION Y CRIOPRESERVACION DE CPSP</b>	
Recolección	12
Separadores de flujo continuo	13
Separadores de flujo discontinuo	14
Reducción de la contaminación hemática	15
Criopreservación	16
Descongelación y reinfusión de CPSP	18
<b>RECONOCIMIENTO Y CUANTIFICACION "IN VITRO" DE COLONIAS DE CPSP</b>	
Técnicas de cultivo de los progenitores	19
Rendimientos de células recolectadas:	
CFU-GM y CMN	20
Otros indicadores de precursores circulantes: células CD34 positivas	24
<b>AUTOTRANSPLANTE DE CPSP. ENSAYOS CLINICOS.</b>	
ATSP en leucemia aguda	
ATSP en LMA	26
ATSP en LLA	27
ATSP en leucemia mieloide crónica	28
ATSP en linfoma y otros tumores sólidos	
ATSP en linfomas	29
ATSP en tumores sólidos	30
ATSP en mieloma múltiple	31

---

	<u>Página</u>
CONTAMINACION TUMORAL EN LAS CELULAS RECOLECTADAS	31
OBJETIVOS	35
MATERIAL Y METODOS	
Pacientes	38
Criterios de inclusión	38
Diagnóstico	39
Definiciones empleadas en el estudio	
Remisión completa	41
Eficacia o rendimiento de la recolección	41
Fracaso del injerto	42
Prendimiento incompleto	42
Recidiva	42
Duración de la remisión y supervivencia	43
RECOLECCION DE CPSP	
Momento de la recolección	43
Técnica de la recolección y separadores empleados	44
Fenwal CS-3000 y 3000 plus	41
Cobe Spectra	50
Haemonetics V-50-I	53
Estudios de citofluorometría	54
PROCESAMIENTO Y CONGELACION CELULAR	
Purificación de CMN	55
Cultivos celulares	55
CRIOPRESERVACION	
Congelación	57
Estudio de viabilidad celular	58
EXTRACCION Y CONGELACION DE MEDULA OSEA AUTOLOGA	58
Purificación y congelación medular	59
PROCEDIMIENTO DE ADMINISTRACION DE CPSP	
Transporte	59
Descongelación e infusión	60
AUTOTRANSPLANTE DE CPSP	
Medidas generales	61
Profilaxis de la cistitis hemorrágica	62
Acondicionamiento	62
Soporte transfusional	63
Profilaxis antiinfecciosa	63
Tratamiento de soporte	65

	<u>Página</u>
Evaluación de la toxicidad	66
Evaluación del prendimiento	66
<b>TRATAMIENTO DE LOS FRACASOS Y RECAIDAS</b>	
Fracasos de prendimiento	67
Recaídas	67
<b>METODOS ESTADISTICOS</b>	
Mecanización informática de los datos	68
Métodos estadísticos	68
Soporte lógico	68
<b>RESULTADOS</b>	
<b>RECOLECCION DE CPSP</b>	
Características de los pacientes	81
Quimioterapia preféresis	83
Características de la sangre periférica	84
Características de las sesiones de recolección	85
Resultados en bolsa de recolección	86
Rendimientos de precursores	87
Marcadores inmunológicos	87
Toxicidad y complicaciones durante la recolección	88
Repercusión de las recolecciones	89
<b>AUTOTRANSPLANTE DE CELULAS PROGENITORAS DE SANGRE PERIFERICA</b>	
Características de los pacientes	
Datos clínicos	106
Datos de bioquímica sérica	107
Datos de hemostasia y coagulación	108
Datos hematológicos de sangre periférica	108
Datos de la médula ósea	108
<b>ACONDICIONAMIENTO E INFUSION DE CELULAS PROGENITORAS</b>	
Regímenes de acondicionamiento	109
Infusión de células progenitoras	109
Toxicidad durante la infusión	110
<b>ANALISIS DE LOS VALORES HEMOPOYETICOS</b>	
Recuperación de neutropenia	111
Factores de crecimiento	111
Recuperación de los recuentos plaquetares	112
Estudio de méula ósea postransplante	113
Infusión de médula ósea autóloga	114

---

	<u>Página</u>
Relación entre recuperación y precursores infundidos	114
Características del soporte transfusional	115
Días de hospitalización	118
<b>TOXICIDAD DEL ACONDICIONAMIENTO Y COMPLICACIONES</b>	
Toxicidad del acondicionamiento	118
Otras complicaciones	121
<b>LEUCEMIA MIELOBLASTICA AGUDA EN PRIMERA RC</b>	
Duración de la remisión	122
Recidivas	123
Supervivencia	123
Supervivencia libre de enfermedad	124
<b>RESTO DE LA SERIE</b>	<b>130</b>
<b>COMPLICACIONES TARDIAS</b>	<b>131</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>137</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>157</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>162</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>166</b>

---

AcMo	= Anticuerpo monoclonal
ATA	= Arabinósido de citosina, 6-tiuoguanina y amsacrine
ATSP	= Autotransplante de sangre periférica
Bu	= Busulfan
CFU-C	= Unidad formadora de colonias
CFU-GM	= Unidad formadora de colonias gránulo-monocíticas
CH	= Concentrados de hematíes
CMN	= Células mononucleares
CPSP	= Células pogenitoras de sangre periférica
COAP	= Ciclofosfamida, vincristina, arabinósido de citosina y prednisona
Cy	= Ciclofosfamida
DE	= Desviación estándar
DMSO	= Dimetilsulfóxido
EH	= Enfermedad de Hodgkin
EiCh	= Enfermedad injerto contra huésped
EVOH	= Enfermedad veno-oclusiva hepática
g	= Gramo
G-CSF	= Factor estimulante de colonias granulocíticas
GM-CSF	= Factor estimulante de colonias gránulo-monocíticas
Hb	= Hemoglobina
IFN	= Interferon
kg	= Kilogramo
L	= Litro
LLA	= Leucemia linfoblástica aguda
LMA	= Leucemia mieloblástica aguda
LMC	= Leucemia mieloide crónica
mg	= Miligramo
mL	= Mililitro
PMN	= Polimorfonuclear neutrófilo
PPC	= Plasma pobre en componentes
PRC	= Plasma rico en componentes
RC	= Remisión completa
rpm	= Revoluciones por minuto
SLE	= Supervivencia libre de enfermedad
TAMO	= Transplante autólogo de médula ósea
TMO	= Transplante de médula ósea



# **INTRODUCCION**

**MOTIVACION DE LA TESIS**

Durante los últimos 20 años el transplante de médula ósea (TMO) ha pasado de ser una modalidad de tratamiento para enfermos en los que se habían agotado todos los recursos terapéuticos hasta ser considerado, hoy en día, como un tratamiento curativo de elección para un importante número de pacientes con leucemia, aplasia medular y un creciente número de otras enfermedades. El cada vez mayor número de centros en los que se emplea esta terapéutica y la repercusión que en otras áreas de la Medicina ejerce, ha hecho que el TMO, inicialmente desarrollado en la terapia global de la leucemia aguda, alcance una dimensión y entidad propias, hecho reconocido por la comunidad científica internacional con la concesión el pasado año del Premio Nobel de Medicina a su impulsor, el Dr. E.D. Thomas. Además, el progresivo desarrollo de la Inmunología y la Biología Molecular y su influencia para un mejor conocimiento del TMO, han convertido el estudio de los trasplantes medulares en uno de los más activos e interesantes campos de investigación de la Hematología actual.

Por esto, cuando en Julio de 1989, tras el XVIII Congreso de Hematología Experimental celebrado en París, el Dr. M.A. Sanz me propuso poner en marcha en la Unidad de Leucemias Agudas del hospital, una reciente modalidad de

autotransplante realizado a partir de precursores hematopoyéticos circulantes en sangre, la idea me fascinó. Fascinación a la que se añadió el reto que suponía la responsabilidad de la coordinación de una nueva terapéutica con importante influencia en numerosos campos de la Medicina. Reflejo del interés y actualidad del tema son los numerosísimos trabajos publicados sobre sus diferentes vertientes en los últimos tres años y la realización con carácter bianual, de un congreso internacional dedicado exclusivamente a su desarrollo y actualización.

Con este mismo interés e ilusión se comenzó este proyecto, al presentar ahora el trabajo de estos 18 meses muchos interrogantes quedan aún por despejar. Contribuir siquiera parcialmente a la resolución de otros ha sido, y no otro, el motivo de esta Tesis.

---

**AUTOTRANSPLANTE A PARTIR DE CELULAS PROGENITORAS  
RECOLECTADAS DE SANGRE PERIFERICA COMO ALTERNATIVA AL  
TRANSPLANTE AUTOLOGO DE MEDULA OSEA**

En los últimos 20 años, el progreso en el tratamiento de la leucemia aguda tanto linfoblástica (LLA) como mieloblástica (LMA) ha sido considerable. Así, más de un 90% de niños y entre el 75-85% de adultos con LLA alcanzan remisión completa (RC) con tratamientos quimioterápicos. Aunque no tan evidente, el progreso en la terapia de la LMA también ha sido substancial. La inducción intensiva y la terapia de consolidación han conseguido incrementos en los porcentajes de remisión completa que van desde un 25% hasta más de un 70% y han aumentado la supervivencia media de seis meses a más de dos años. Claramente, hoy en día el principal reto en el tratamiento de la leucemia aguda es evitar la aparición de recaídas en un porcentaje de pacientes cada vez mayor. Este objetivo potencialmente podría alcanzarse mediante las denominadas "megaterapias", es decir, administrando muy altas dosis de citostáticos con actividad antileucémica que produzcan una supresión de la hemopoyesis por encima de la capacidad de regeneración de la función medular. Sin embargo, esta toxicidad de la quimioterapia supone la principal limitación para el uso de nuevos y más agresivos tratamientos citotóxicos en pacientes con hemopatías malignas. De acuerdo con esto, la administración de dosis elevadas de quimioterápicos podría realizarse

---

siempre que se dispusiese de un soporte hemopoyético que permita "rescatar" al paciente de una aplasia medular que de otra forma sería irreversible. Este objetivo puede conseguirse temporalmente mediante la administración de hemoderivados, pero los efectos de una mielosupresión permanente solo pueden superarse con un injerto de células hemopoyéticas capaces de repoblar la médula y reconstituir de manera global el sistema hemopoyético e inmune del receptor. En pacientes con leucemia aguda puede lograrse mediante un transplante de médula ósea (TMO) efectuado a partir de un donante sano. El TMO tanto de gemelos idénticos (singénico) como de donantes emparentados HLA-compatibles y con cultivo mixto linfocitario negativo (alogénico) es en este sentido, una eficaz estrategia terapéutica para buen número de pacientes con leucemia aguda tanto linfoblástica como mieloblástica que, de esta manera, pueden beneficiarse de los efectos intensamente antitumorales de los regímenes de acondicionamiento pretransplante con altas dosis de quimioterapia y/o radioterapia. Sin embargo, la aparición de complicaciones como la denominada enfermedad injerto contra huesped (EICH), en la que los linfocitos T del donante actúan contra los antígenos tisulares del receptor, y la inmunosupresión prolongada permanecen como las principales causas de morbilidad y mortalidad entre los enfermos sometidos a TMO, con una incidencia más elevada conforme se incrementa la edad de los enfermos. Además, la necesidad de disponer de un donante HLA-idéntico hace que tan solo un

tercio de los enfermos con leucemia aguda sea candidato a esta terapéutica potencialmente curativa. Para que una mayor población de enfermos pudieran beneficiarse de estos tratamientos, se han desarrollado otras modalidades de trasplante como el TMO autólogo (TAMO) en el que las células precursoras proceden de la médula ósea del propio paciente. En este caso, la estrategia terapéutica persigue la obtención de una remisión con quimioterapia convencional y la posterior recolección de médula ósea, siendo criopreservada hasta su reinfusión tras la administración de quimio/radioterapia supraletal para erradicar las células tumorales residuales (DICKE y cols. 1979). No obstante, el principal problema en estos enfermos es la recidiva de la enfermedad. Entre los mecanismos implicados en la aparición de recaídas están la incapacidad de eliminar todas las células neoplásicas en el paciente, la contaminación leucémica de las células almacenadas, o ambos mecanismos simultáneamente. Del mismo modo, los pacientes con afectación tumoral de médula o con enfermedades subyacentes con alto riesgo para la anestesia general tampoco podrán beneficiarse de esta opción terapéutica. Es por esto que el desarrollo recientemente de una nueva variedad de autotrasplante, empleando células progenitoras multipotentes de sangre periférica (CPSP), permite ampliar las indicaciones de autotransplante a una mayor población de pacientes pudiendo efectuarse incluso en caso de infiltración o fibrosis medular.

**IDENTIFICACION DE PRECURSORES CELULARES CIRCULANTES**

Las primeras evidencias que demostraron la presencia en sangre de células con capacidad de regeneración hemopoyética fue obtenida por GOODMAN y HODGSON (1962) y por TROBAUGH y LEWIS (1964) en animales de experimentación. Estos hallazgos fueron confirmados clínicamente por EPSTEIN y cols. en 1966 al demostrar en perros la posibilidad de una reconstitución hemopoyética medular a partir de elementos celulares de sangre periférica. Estudios de cultivo "in vitro" demostraron la presencia de células "tronco" ("stem cells") o precursoras circulando habitualmente en sangre en la fracción de las células mononucleares (CMN), tanto de animales como de humanos. Asimismo, demostraron la correlación existente entre la presencia de éstas células y las CFU-C o unidades formadoras de colonias granulomonocíticas en agar. Para algunos autores (NOTHDURFT y cols. 1977) se podía considerar la cantidad de CFU-C en sangre como un indicador útil de la capacidad de regeneración hemopoyética medular. En 1978, FAUSER y MESSNER desarrollaron un sistema de cultivo que permitía el crecimiento de colonias de elementos eritroides, granulocíticos, monocito-macrófagos y megacariocíticos en médula ósea, sangre periférica y cordón umbilical de humanos; en 1981 se demostró también "in vitro", tanto en

médula como en sangre, la presencia de células hemopoyéticas con capacidad formadora de colonias mixtas conteniendo elementos de todas las series hemopoyéticas (CFU-GEMM) con capacidad de autorrenovarse y originar, secundariamente, elementos hemopoyéticos más diferenciados, sugiriendo una capacidad multipotente a los progenitores cultivados (ASH y cols. 1981). Posteriormente, estudios comparativos entre las células precursoras tanto de médula como de sangre demostraron que, si bien existían ciertas diferencias entre ambos progenitores, éstos eran idénticos tanto en tamaño como en densidad. Sin embargo, no se ha desarrollado ninguna técnica de cultivo que permita identificar las células germinales pluripotentes responsables de la reconstitución hemopoyética a largo plazo, habiéndose cultivado solo progenitores comprometidos en el desarrollo de una línea celular. No obstante, este hecho no excluye su presencia en sangre y tampoco la capacidad de ésta para repoblar de manera estable una médula ósea aplásica, como han demostrado experimentos en animales (EPSTEIN y cols. 1966, BRADLEY y cols. 1966, DEBELAK-FEHIR y cols. 1975a y 1975b, CALVO y cols. 1976, STORB y cols. 1977).

#### RECOGIDA DE CELULAS PROGENITORAS

Una vez demostrada la presencia de células progenitoras en sangre así como su capacidad de reconstitución hemopoyética, se planteó la necesidad de un sistema fácil y



---

rápido que permitiese la obtención de elevadas cantidades de CPSP para su empleo como rescate medular tras tratamiento de acondicionamiento. Con este objetivo se emplearon los separadores celulares de uso habitual en clínica. Estos procesadores separan por centrifugación los componentes sanguíneos en función de su diferente densidad, permitiendo mediante programas adecuados recolectar la fracción de CMN y, por tanto, de CPSP en cantidades elevadas (WEINER y cols. 1977, MOTT y cols. 1977, RICHMAN y cols. 1977, KÖRBLING y cols. 1977). En 1980, RICH y cols. publicaron un caso de reconstitución inmune con leucocitos de sangre periférica obtenidos por citaféresis en un paciente con inmunodeficiencia grave secundaria a un déficit de adenosin-deaminasa. En este caso, el donante rehusó la extracción de médula pero consintió ser sometido a leucaféresis. No obstante, subsiguientes ensayos clínicos administrando CMN de sangre periférica procedentes de donantes histocompatibles a enfermos con hemoglobinuria paroxística nocturna y con tumores sólidos, fracasaron en lograr una recuperación hemopoyética mantenida (HERSHKO y cols. 1979, ABRAMS y cols. 1980), probablemente por la infusión de un número insuficiente de éstos precursores. Efectivamente, la concentración de CPSP en animales en condiciones normales oscila entre 1/10 a 1/25 de la encontrada en médula, con una relación entre las células "stem" y las células nucleadas de hasta 100 veces menor (NOTHDURFTF y cols. 1977). En seres humanos la concentración

de CPSP circulantes oscila entre 1-10% de las presentes en médula como demostraron diversos autores (McKREDIE y cols. 1971, KURNICK y cols. 1977), por lo tanto el número de CFU-GM recolectadas en una leucaféresis oscilaría entre  $2-2,5 \times 10^5$  (equivalentes a unos  $0,3 \times 10^4$  /kg en adultos). Esto implica la necesidad de efectuar un elevado número de citaféresis (20-30) para obtener una cifra de CPSP comparable a la que se obtiene tras una recolección normal de médula ósea. Sin embargo, nuevos experimentos demostraron la posibilidad de incrementar las CPSP circulantes, lo que permitiría la obtención de suficiente cantidad de CPSP con un número más reducido de leucaféresis (BARR & McBRIDE, 1982a).

## 1. Métodos para incrementar el rendimiento de CPSP.

### 1.1 Quimioterápicos.

Entre los procedimientos empleados para aumentar la cifra de CPSP circulantes, el más empleado ha sido la administración de quimioterapia, recolectándose las células en el período de recuperación de la aplasia postquimioterapia, lo que coincide con la aparición de una monocitosis de manera prácticamente constante. Efectivamente, estudios realizados en animales pusieron de manifiesto un incremento de CMN en sangre tras la fase de recuperación de una aplasia producida por quimioterapia y/o radioterapia intensiva, con cifras varias veces superiores a

---

su valor normal, demostrándose su correlación con las colonias de CFU-C presentes en cultivos "in vitro" (DeWYS y cols. 1970, ABRAMS y cols. 1981). Estos hallazgos demostraron la posibilidad de recolectar una mayor cantidad de CMN durante esta fase y, por lo tanto, una mayor capacidad de reconstitución hemopoyética. Un incremento de CPSP tras la quimioterapia fue inicialmente demostrado por RICHMAN y cols., en 1976, quienes observaron niveles de CFU-C circulantes de hasta 20 veces su valor basal en nueve de 14 pacientes con carcinoma de ovario a los 15-21 días de tratamiento con ciclofosfamida y daunorrubicina. La comprobación clínica de este fenómeno fue realizada por ABRAMS y cols., en 1981, al demostrar un incremento de hasta 16 veces la cifra de CPSP circulantes en perros tratados con ciclofosfamida. Posteriormente, su recolección mediante leucoaféresis y su infusión como rescate tras aplasia quimioterápica de médula ósea se seguían de una repoblación medular y una restauración de la función hemopoyética. Desde entonces, han sido varios los trabajos que han confirmado el incremento del número de CPSP circulantes tras quimioterapia facilitando la recolección coincidiendo con la fase acelerada de la recuperación hemopoyética (STIFF 1983, TO y cols. 1987, LASKY y cols. 1989a, 1989b).

## 1.2. Modificadores de la respuesta biológica.

Más recientemente, la administración de factores de crecimiento, particularmente el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) y granulomonocíticas (GM-CSF), administrados de forma aislada o con quimioterapia se ha ensayado para incrementar el rendimiento de CPSP (DÜHRSEN y cols. 1988, SOCINSKI y cols. 1988, GIANNI y cols. 1989, RAVAGNANI y cols. 1990). Si bien preliminares, los resultados evidencian importantes incrementos de CMN y CFU-GM por lo que aparecen como terapéutica potencialmente útil para mejorar el rendimiento de las citaféresis.

De forma experimental, se ha empleado también la administración de interleukinas (Il-3, Il-6) para incrementar las células progenitoras en cultivos "in vitro". Esta técnica ha demostrado aumento en las colonias, especialmente de megacariocitos (SMITH y cols. 1988, LASKY y cols. 1989d). No obstante, aún es muy pronto para sacar alguna conclusión que pueda aplicarse a la práctica clínica.

## RECOLECCION Y CRIOPRESERVACION DE CPSP.

### 1. Recolección.

Como ya se ha mencionado, las CPSP son recogidas durante los períodos de recuperación hemopoyética coincidentes con las cifras más elevadas de células

progenitoras tras la administración de tratamiento citorreductor, con o sin el empleo de factores de crecimiento. Esta recolección puede efectuarse mediante separadores celulares de uso habitual en clínica, como ha sido demostrado por diversos autores (KÖRBLING y cols. 1977, RICHMAN y cols. 1977, BARR y cols. 1982b, LASKY y cols. 1982 y 1987).

### 1.1. Separadores de flujo continuo.

Varios han sido los modelos de máquinas separadoras empleados para la recolección de CPSP. En estos, los programas de obtención de CMN (linfóferesis) han sido los que han producido los mejores rendimientos.

Entre los separadores de células, el más ampliamente utilizado ha sido el de flujo continuo CS-3000 (Fenwal Laboratories, Deerfield, Illinois) que permite la recolección totalmente automatizada de células o plasma mediante el empleo de programas establecidos para plaquetóferesis o linfóferesis. Efectuando ligeras modificaciones, como la elevación de la velocidad de centrifugación a 1.400 rpm podemos recolectar cifras de CMN más elevadas con escasa contaminación de neutrófilos (LASKY y cols. 1982). La sangre del paciente es bombeada a velocidad constante hacia bolsas de recogida situadas en la cámara de recolección, separada mediante centrifugación, en función de la diferente densidad de sus componentes, en concentrado de hematíes y plasma rico en células. Los

hematíes son reinfundidos al enfermo mientras que el plasma rico en células es almacenado en las bolsas de recolección. No obstante, éstos programas tienden a recolectar cantidades elevadas de plaquetas debido a la similar densidad con las células nucleadas. Es por esto que es necesario con frecuencia realizar una segunda centrifugación a pocas rpm ("soft spin") para separar y reinfundir al enfermo la mayor cantidad posible de plaquetas.

Otro separador de flujo continuo empleado es el Cobe Spectra (Cobe Apheresis System, Cobe Laboratories, Inc., Lakewood, Colorado), con ligeras diferencias respecto al anterior como la forma de la cámara de recolección. En el Cobe Spectra dicha cámara es circular de plástico rígido y con la interfase plasma/buffy coat/hematíes visible para el operador. En todos los modelos de flujo continuo el volumen procesado habitualmente para obtener un número adecuado de CMN es el doble de la volemia del paciente.

## 1.2. Separadores de flujo discontinuo.

Las máquinas de flujo discontinuo habitualmente empleadas son la Aminco Celltrifuge (American Instruments Company, Silver Spring, USA), la Haemonetics Modelo 30 y especialmente, la V-50-I (Haemonetics Corporation, Braintree, Massachusetts). En estos procesadores la sangre es impulsada hacia la cámara separadora en forma de campana donde, por centrifugación se separan los hematíes que ocupan la periferia, del plasma y células que permanecen en el

centro de la cámara donde se encuentra el sistema de salida. Una vez la cámara se ha llenado, por rebosamiento se expulsan plasma y células (leucocitos y plaquetas) hacia la bolsa de recolección. Los hematíes almacenados en la cámara son devueltos entonces al paciente por un proceso de centrifugación inverso a través de una bolsa de plástico conectada a una vía venosa. Los separadores de flujo discontinuo tienen la ventaja de su fácil manejo y transporte además de poder emplearse cuando se dispone de un solo acceso venoso. Sin embargo, requieren un volumen extracorpóreo relativamente grande por lo que ocasionan más episodios de hipotensión. Al igual que en los de flujo continuo, la sangre que se reinfunde está citratada por lo que puede asociarse toxicidad del anticoagulante si se hace rápidamente. Más recientemente, con la introducción de ciertas modificaciones en el sistema (procedimiento de elutriación) parece obtenerse resultados comparables a los separadores de flujo continuo (KESINGER y cols. 1989). En estas máquinas el proceso se mide en tiempo, siendo lo habitual una duración de 4-5 horas por sesión.

### 1.3. Reducción de la contaminación hemática.

Dado que la mayoría de los hematíes y granulocitos recolectados son destruidos durante la congelación y descongelación, es necesario reducir al mínimo éstos elementos en el material que posteriormente se infundirá. Para eliminar la mayoría de los hematíes puede efectuarse un

"buffy coat", mientras que para eliminar tanto glóbulos rojos como neutrófilos algunos autores efectúan una centrifugación con Ficoll o Percoll previo a la congelación (TILLY y cols. 1986, LAW y cols. 1988). Del mismo modo, pueden usarse sustancias para facilitar la sedimentación y agrupación eritrocitaria durante el proceso de recolección (hidroxietilalmidón) (KÖRBLING y cols. 1986). La presencia y concentración de CPSP se analiza en cada una de las alicuotas obtenidas en las leucaféresis antes y después de la criopreservación.

## 2. Criopreservación.

Mientras el TMO alogénico se realiza con células hemopoyéticas obtenidas el mismo día de la infusión, los trasplantes autólogos tienen lugar tras un período de tiempo durante el cual las células hemopoyéticas obtenidas deben almacenarse para mantener su viabilidad. En este sentido, las condiciones de almacenamiento convencional empleadas para los hemoderivados no se han demostrado adecuadas para este propósito (MANGALIK y cols. 1979). Esto llevó a la aplicación de los sistemas de congelación de precursores hemopoyéticos medulares a las CPSP recolectadas en perros (FLIEDNER y cols. 1975) y hombres (DEBELAK-FEHIR y cols. 1975). Estas células han sido almacenadas y recuperadas con éxito durante más de dos años (FLIEDNER y cols. 1977, WELLS y cols. 1980). Asimismo, se ha demostrado



su viabilidad clínica restaurando la integridad hemopoyética tanto en animales (DEBELAK-FEHIR y cols 1975, FLIEDNER y cols. 1977) como en seres humanos (GOLDMAN y cols. 1978, LASKY y cols. 1978, JUTTNER y cols. 1985).

Para una adecuada criopreservación de las células progenitoras, cada paso del procedimiento debe ser cuidadosamente controlado, incluyendo el aislamiento y purificación de CMN, el número total de CMN, la concentración del crioprotector, la velocidad de congelación y el proceso de descongelación y lavado. Las CMN son separadas de forma rutinaria mediante un gradiente de centrifugación efectuado en Ficoll-Hypaque. Las células procesadas pueden congelarse para su almacenamiento prolongado en bolsas de plástico en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}$  C. Como crioprotector se han empleado el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO) o la polivinilpirrolidona (PVP). El más usado es el DMSO, obtenido a partir de la destilación del petróleo. Este agente tiene la ventaja de penetrar rápidamente en la células, no siendo necesaria su eliminación tras la descongelación, ya que su administración endovenosa posee escasa toxicidad.

El método de congelación más empleado consiste en alcanzar una concentración final de 10-20% de DMSO y un proceso controlado de congelación hasta  $-80^{\circ}$  C. El descenso gradual de la temperatura ( $-1^{\circ}$  C/min) evita la cristalización intracelular hasta la liberación del calor de fusión, que corresponde al paso de la sangre del estado

líquido al sólido y que se produce a  $-7^{\circ}$  C. Posteriormente son almacenadas en tubos o en bolsas de Teflón o poliolefina en nitrógeno en fase líquida a  $-196^{\circ}$  C (GORIN 1986, LASKY 1989c). De esta manera se produce un bloqueo criogénico total y homogéneo de todos los sistemas enzimáticos celulares. Con este sistema, la viabilidad de las células pluripotentes se encuentra entre el 60-70% (FABIAN y cols. 1982). Un sistema alternativo de criopreservación consiste en el empleo de una combinación de DMSO e hidroxietilalmidón como crioprotector y su almacenamiento a  $-80^{\circ}$  C (STIFF y cols. 1983). Un ensayo clínico empleando este sistema de congelación ha sido publicado recientemente (STIFF y cols. 1987), mostrando cierto retraso en el prendimiento de la serie plaquetar, lo que algunos autores han atribuido a la diferente técnica de congelación empleada (LASKY 1989c).

### 3. Descongelación y reinfusión de las CPSP.

La infusión al paciente se realiza mediante equipos de transfusión desprovistos de filtro a través de una vía venosa central. Las células son previamente descongeladas de forma rápida en baño maría a  $37^{\circ}$  C, para evitar la agregación celular y la exposición prolongada postdescongelación al DMSO, que es altamente tóxico para las células hemopoyéticas, pudiendo destruir hasta el 50% de CFU-GM en 15 minutos. Además la rapidez de la descongelación evita el fenómeno de recristalización y el "shock" de

dilución. Los efectos secundarios descritos por el DMSO son generalmente leves y fácilmente controlables con antihistamínicos y/o corticoides intravenosos. Una vez reinfundidas, las células progenitoras circulan por el torrente sanguíneo, atraviesan la pared de los sinusoides medulares y se alojan en el seno de la médula ósea, donde hallan el ambiente propicio para su proliferación y maduración.

#### RECONOCIMIENTO Y CUANTIFICACION "IN VITRO" DE COLONIAS DE CPSP. RELACION ENTRE LA DOSIS Y LA RECONSTITUCION HEMOPOYETICA

##### 1. Técnicas de cultivo de los progenitores celulares.

La aplicación clínica del trasplante autólogo de CPSP requiere conocer la viabilidad y la identificación de los progenitores que se infunden así como la valoración de la cantidad mínima de CPSP a infundir. La técnica de cultivo más ampliamente empleada ha sido la descrita por FAUSER y MESSNER en 1978, modificada según ASH y cols. en 1981 para la obtención de un número mayor de colonias de CMN. Estos autores modificando el medio de cultivo de Iscove añadiendo mercaptoetanol, obtiene un número de colonias superior a las de la técnica original. Otros autores emplean para cultivo de precursores granulocitomacrófagos la técnica descrita

por PIKE y ROBINSON (1971) o la de ISCOVE en metil-celulosa (ISCOVE y cols. 1971). Para valorar la viabilidad celular se aplican estas técnicas empleadas en cultivos medulares (PIKE y ROBINSON 1971, FAUSER y MESSNER 1978 y 1979), esencialmente la tinción del azul tripán o de naranja de acridina y cultivo en agar por siembra directa y recuento posterior de las CPSP. En 1984, TO y cols. consiguieron recoger y criopreservar grandes cantidades de precursores de la línea granulomonocítica (CFU-GM) circulantes en pacientes diagnosticados de LMA. Estos autores demostraron que una media de  $11 \pm 2 \times 10^4$  CFU-GM/kg puede ser conservada y criopreservada adecuadamente durante 24 meses, siendo esta cantidad cinco veces superior a la necesaria para conseguir una recuperación hemopoyética completa (SPITZER y cols. 1980).

## 2. Rendimientos de células recolectadas: CFU-GM y CMN.

Respecto al momento óptimo de recolección, si bien no está definitivamente establecido, la mayoría de los autores están de acuerdo con llevarlo a cabo en el momento de la recuperación celular postquimioterápica, coincidiendo con los niveles más altos de CPSP, alcanzando cifras de CFU-GM por citaféresis de hasta dos veces lo obtenido tras la aspiración de un litro de médula (TO y cols. 1984). Como ya hemos citado, la aparición de una monocitosis coincidiendo con la recuperación medular ha sido un índice empleado por

algunos autores para decidir el inicio de las citaféresis.

Si bien se ha podido evidenciar una relación entre las células pluripotentes reinfundidas y la recuperación hemopoyética, tanto la identidad de las células precursoras con capacidad de regeneración hemopoyética como el número mínimo a infundir que garantice su prendimiento medular no están claramente definidos. Para algunos autores ( LASKY y cols. 1982, GEISSLER y cols. 1986), la presencia de progenitores más inmaduros y con capacidad de diferenciarse hacia cualquier línea hemopoyética (CFU-mix, CFU-GEMM) sería un indicador más fiable de una regeneración hemopoyética mantenida, mientras que si la infusión es principalmente con células con un mayor grado de maduración (CFU-GM) es posible la aparición de una insuficiencia medular una vez las células infundidas hayan superado su vida media al tener éstas unas expectativas de vida más limitadas. Por otra parte, el momento de mayor presencia de células pluripotentes circulantes puede preceder en uno o dos días al de los precursores más diferenciados, con lo que éstos no serían indicadores fieles de la capacidad de repoblación medular de las células recolectadas. No obstante, y dado que no se dispone de una técnica que permita el cultivo de estas células pluripotentes, se emplean cultivos de progenitores diferenciados en el sentido de una u otra línea celular (CFU-GM, BFU-E) como indicadores de viabilidad del injerto.

El número mínimo de células a infundir también varía según los diferentes autores. Así, se han descrito resultados favorables con cifras menores de  $10 \times 10^4$  CFU-GM/kg (KESSINGER y cols. 1986, CASTAIGNE y cols. 1988), mientras que para otros sería necesario un número no inferior a  $50 \times 10^4$  CFU-GM/kg para asegurar una recuperación hemopoyética completa y permanente (TO y cols. 1986). Estas diferencias se originan en gran medida por propia naturaleza de los ensayos de laboratorio efectuados para la detección de los precursores celulares. El cultivo de CFU-GM que es el indicador de la capacidad regenerativa de las células recolectadas más ampliamente empleado, se realiza con diversas técnicas, por lo que los resultados no son comparables; asimismo, los ensayos pueden verse afectados por gran número de factores extrínsecos como la fuente de actividad estimulante de colonias, las condiciones de incubación, la presencia de células contaminantes (monocitos), etc. Por lo tanto y como en el TMO, algunos autores han confiado en que el recuento de CMN sirva para definir el rendimiento celular y el inicio de las recolecciones (ABRAMS y cols. 1981, STIFF y cols. 1983, KÖRBLING y cols. 1986, BELL y cols. 1987, KESSINGER y cols. 1988b, CASTAIGNE y cols. 1988). La observación prácticamente constante de una monocitosis relativa coincidiendo con la recuperación medular tras quimioterapia agresiva, y su correlación con la presencia de un elevado número de CPSP, convierten esta determinación en un método simple y rápido

para determinar el momento de la recolección, mientras que el valor de CMN recolectado sería un indicador rápido y fiable de la regeneración hemopoyética.

Por otra parte, la relación existente entre los diferentes compartimentos celulares (células pluripotentes/células comprometidas/células maduras) se mantiene estable en situación basal por la existencia de un flujo continuo de elementos celulares de los compartimentos más inmaduros a los más maduros, por lo tanto, la dosis de CMN en estas situaciones, se puede considerar como un indicador fiable de recuperación hemopoyética. No obstante, durante la fase de recuperación rápida de la hemopoyesis tras quimioterapia, los elementos pluripotentes y comprometidos proliferan para llenar el compartimento de los elementos maduros, alterándose la relación entre células pluripotentes/células comprometidas/células maduras, por lo que el número de células progenitoras sería un mejor indicador de reconstitución hemopoyética que las CMN al estar ontogénicamente más cerca de los elementos germinales pluripotentes (TO 1990a). Sin embargo, además de las dificultades en la estandarización de la dosis mínima de CFU-GM a infundir, dada la enorme variación entre laboratorios, las dos semanas de tiempo transcurridas hasta la obtención de los resultados hacen de esta técnica una guía poco práctica para indicar la capacidad de regeneración hemopoyética de las células recolectadas.

### 3. Otros indicadores de precursores circulantes: Células CD34 positivas.

Recientemente, se está tratando de encontrar una relación entre el número de células CD34 positivas y CD33 negativas mediante inmunofluorescencia directa y los niveles de CPSP circulantes que pueda servir como indicador útil del momento de recolección (GIANNI y cols. 1989, SIENA y cols. 1989, 1991). Así, se ha podido comprobar la presencia de una glicoproteína de superficie en las células precursoras hemopoyéticas, que reacciona frente a anticuerpos monoclonales (AcMo) como el CD34. En adultos normales estas células CD34+/CD33- suponen el 1-4% de las CMN de médula e incluyen los progenitores de las diversas líneas celulares granulomonocíticas (CFU-GM), eritroides (BFU-E), megacariocíticas (CFU-Mk) y multilineales (CFU-mix). Sin embargo, y a pesar de que los valores basales en sangre de estas células se encuentran por debajo del umbral de detección por citometría, se ha comprobado, tanto mediante cultivos "in vitro" como con estudios inmunofenotípicos, un importante incremento en sangre de precursores CD34+/CD33- en la fase de recuperación hematológica que sigue al tratamiento con altas dosis de quimioterapia (GIANNI y cols. 1989, SIENA y cols 1989). Asimismo, también se han demostrado rendimientos superiores de estas células mediante citoféresis realizadas en el momento adecuado que mediante



punciones medulares repetidas, con diferencias más acusadas si se administran factores de crecimiento endovenosos previos a la recolección (SOCINSKI y cols. 1988, GIANNI y cols. 1989, RAVAGNANI y cols. 1990). Igualmente, los antígenos de diferenciación de la membrana celular y las características de crecimiento in vitro de las colonias son iguales para las células CD34+, tanto de médula ósea como de sangre periférica, lo que confirma el origen medular común de ambas. Diversos ensayos clínicos han demostrado la relación existente entre el número de células CD34+/CD33- en sangre tras quimioterapia de movilización y las CFU-GM habiéndose estimado el número mínimo de estas células que garantice un prendimiento medular en  $7,8 \times 10^6$  /kg (SIENA y cols. 1991). La gran reproductibilidad de la técnica hace de ésta determinación, bien por citofluorometría o técnica fosfatasa-antifosfatasa (FAAFA), un método rápido y útil como indicador de la eficacia de la recolección de CPSP.

#### **AUTOTRASPLANTE DE CPSP. ENSAYOS CLINICOS.**

Hasta la actualidad se han efectuado unos 300 ATSP, de ellos más de la mitad en los últimos cuatro años, y casi todos en pacientes con hemopatías malignas (leucemia aguda, linfomas Hodgkin y no Hodgkin, mieloma).

## 1. ATSP en leucemia aguda.

### 1.1 ATSP en LMA.

El mayor número de ATSP se ha efectuado en pacientes con leucemia aguda, especialmente LMA. TO y cols. demostraron en 1984 la recolección de elevadas cantidades de CPSP (expresadas como CFU-GM) en pacientes con LMA en el período de recuperación postquimioterapia, así como su viabilidad tras 18 meses de almacenamiento a  $-196^{\circ}$  C. Si bien los primeros ensayos clínicos se efectuaron en pacientes con LMA en segunda o posterior remisión (REIFFERS y cols. 1985, JUTTNER y cols. 1985), la mayoría de las serie publicadas hacen referencia a pacientes en primera RC. En estos enfermos, las células son recolectadas una vez alcanzada la RC tras quimioterapia de inducción y de consolidación con un número de sesiones que oscila entre los diferentes autores entre 3 y 7, siendo criopreservadas hasta su empleo como rescate tras la administración de megaterapias. Los resultados actuales han demostrado que una de las principales ventajas de este tipo de autotransplante, empleando CPSP (ATSP), es la rápida recuperación de la neutropenia, con la consiguiente disminución del riesgo infeccioso. Esta recuperación hematológica es habitualmente mantenida, citándose, no obstante, algunos casos de disminución de contajes de células circulantes a las 2-3 semanas después del ATSP, cuando la cantidad de células

progenitoras administrada ha sido escasa (BELL y cols. 1987).

Existen importantes diferencias entre los diversos autores respecto a las recidivas. Efectivamente, LAPORTE y cols. (1987) citan tres casos de recidiva precoz en un total de cuatro pacientes con LMA en primera RC a los que se les había efectuado un ATSP, por lo que cuestiona la utilidad de esta terapéutica. No obstante, estos resultados no han sido confirmados por otros autores que cifran un porcentaje de recidivas mucho menor y similar al observado tras TAMO (CASTAIGNE y cols. 1986, REIFFERS y cols. 1988, JUTTNER y cols. 1988, BELL y cols. 1988, CASTAIGNE y cols. 1988, JUTTNER y cols. 1990, REIFFERS y cols. 1991, KÖRBLING y cols. 1991).

#### 1.2 ATSP en LLA.

Aunque en número mucho menor, el ATSP ha sido empleado también en pacientes con LLA (TILLY y cols. 1986, BELL y cols. 1986, CASTAIGNE y cols. 1988, TAKAUE y cols. 1989). En estas series se incluyen pacientes tanto en primera como en ulteriores remisiones, lo que hace más difícil el análisis de los resultados. No obstante, los resultados referidos a la recuperación hemopoyética son similares a los de los pacientes con LMA.

## 2. ATSP en leucemia mieloide crónica.

Actualmente el único tratamiento curativo para la leucemia mieloide crónica (LMC) es el TMO alogénico. Sin embargo, dado que éste solo puede efectuarse en menores de 50 años siempre que dispongan de donante HLA idéntico, se han diseñado nuevas alternativas terapéuticas para pacientes sin donante compatible como el TAMO y, más recientemente, el ATSP. Las primeras experiencias con ATSP en LMC fueron realizadas por GOLDMAN en 1978 al comprobar la presencia de importantes cantidades de células pluripotentes Ph<sup>+</sup> positivas circulantes durante la fase crónica de la enfermedad que podían reinfundirse y lograr una reconstitución hemopoyética tras quimioterapia de acondicionamiento (GOLDMAN y cols. 1978). Otros autores también han empleado este tipo de trasplante con células obtenidas durante la fase crónica en pacientes con LMC en transformación (REIFFERS y cols. 1983, PREISLER y cols. 1984, HAINE y cols. 1984, KARP y cols. 1985). En todos estos trabajos se logra establecer una segunda fase crónica pero de muy breve duración (4-6 meses).

Recientemente, se han obtenido resultados aparentemente muy superiores mediante la realización de un doble ATSP seguido de la administración de alfa-interferón (IFN) en LMC en transformación, con respuestas hematológicas en casi todos los casos y remisiones citogenéticas hasta en un tercio de los pacientes (REIFFERS y cols. 1991a). Aunque muy

preliminares, estos resultados suponen un importante avance en la terapéutica de esta enfermedad especialmente para pacientes sin donante HLA compatible y pronóstico peyorativo.

### 3. ATSP en linfoma y otros tumores sólidos.

El ATSP en estas neoplasias se ha empleado en pacientes refractarios a tratamientos convencionales o en estadios avanzados.

#### 3.1 ATSP en linfomas.

Tras la realización por KÖRBLING y cols. (1986) de un ATSP con éxito en un paciente con linfoma de Burkitt, varias han sido las series de linfomas que han sido tratados con ATSP. Inicialmente KESSINGER y cols. (1988) refieren el tratamiento de cuatro pacientes con linfomas refractarios (tres con enfermedad de Hodgkin y un LNH) con ATSP. En estos casos no se empleó quimioterapia para incrementar el número de CPSP circulantes. Se obtuvieron dos remisiones completas, recuperando cifras de neutrófilos en los cuatro casos y de plaquetas en tres. Posteriormente estos resultados fueron confirmados en una serie más larga de 40 pacientes con linfomas refractarios en los que se alcanzaba una supervivencia libre de enfermedad equivalente a la de enfermos con similares factores de riesgo y sometidos a autotransplante de médula ósea (KESSINGER y cols. 1989a). En un trabajo publicado por LASKY y cols. (1989b) en el que se

---

comparaban siete pacientes con enfermedad de Hodgkin sometidos a ATSP frente a 19 enfermos con linfoma de Hodgkin a los que se les efectuó un TAMO, se demostró la recolección de un número de progenitores equivalentes a los de médula ósea así como una completa y más rápida recuperación hemopoyética y una menor duración de la hospitalización en el primer grupo de enfermos. Resultados similares han sido referidos por otros autores (BELL y cols. 1986, 1987a, PHILLIPS y cols. 1990).

### 3.2 ATSP en tumores sólidos.

El primer estudio amplio de pacientes con tumores sólidos a los que se les efectuó un ATSP fue publicado por STIFF y cols. en 1987, incluyendo 13 pacientes con carcinoma pulmonar de células pequeñas en siete de los cuales se efectuó un ATSP, observándose en la mayoría de ellos una rápida recuperación de la neutropenia (mediana día 14). El ATSP también ha sido ampliamente empleado en niños con neuroblastoma (LASKY y cols. 1989a, TAKAUE y cols. 1989) con recuperación hemopoyética más rápida que en los casos en los que se empleó médula ósea autóloga. A pesar de la corta edad de los pacientes (entre dos y cinco años) las citaféresis fueron perfectamente toleradas.

#### 4. ATSP en mieloma múltiple.

Uno de los tumores hematológicos en los que el ATSP se está experimentado con más expectativas es el mieloma múltiple. Efectivamente, en los últimos 20 años ha sido escaso el progreso realizado en el tratamiento de estos pacientes, con supervivencias globales que oscilan entre dos y cuatro años. Estos resultados son aún más desalentadores si hacemos referencia a los enfermos con estadios avanzados (estadio III), alcanzándose tan solo remisiones parciales en apenas dos tercios de los pacientes. En estos pacientes cuando se empleó el ATSP, como quimioterapia de movilización se ha empleado melfalan a altas dosis (HENON y cols. 1988) o ciclofosfamida sola o en combinación (FERMAN y cols. 1989a y 1989b, BELL y cols. 1989, REIFFERS y cols. 1989a y 1989b), alcanzándose algún tipo de remisión en todos los casos, siendo completas en el 21-100%. También en estos enfermos se observó una rápida recuperación hemopoyética alcanzando 500 neutrófilos/ $\mu$ L entre 13-18 días y  $50 \times 10^9$  plaquetas/L entre 10 y más de 60 días.

#### CONTAMINACION TUMORAL EN LAS CELULAS RECOLECTADAS.

Como ya se ha mencionado, una posible ventaja del empleo de ATSP frente al TAMO como terapia de rescate es su posibilidad de aplicación para casos con imposibilidad de recolección medular por afectación tumoral o fibrosis. La

siguiente cuestión a determinar es si existen diferencias entre los injertos empleando CPSP o médula ósea en relación a la reinfusión de células neoplásicas y la incidencia de recidivas tumorales. En leucemia aguda, efectuar la recolección precozmente en remisión puede hacer disminuir el problema de la contaminación tumoral, al ser las células leucémicas más susceptibles a la acción de la quimioterapia y proliferar más lentamente que las normales (ARLIN y cols. 1978). Por otro lado, estudios citogenéticos, de biología molecular e inmunológicos efectuados en leucemia aguda en remisión demuestran una menor presencia de células tumorales en sangre que en médula (ZEHNBAUER y cols. 1986, TO y cols. 1987). Sin embargo, la sensibilidad de estos estudios no es bien conocida y su importancia clínica se encuentra por confirmar por lo que actualmente no se conoce el grado de contaminación leucémica entre las CPSP recolectadas (GALE y cols. 1990).

Aunque los linfomas con frecuencia experimentan diseminación hematógica y ocasionalmente pueden detectarse células neoplásicas en sangre, sin embargo, en un estudio empleando CPSP como rescate en pacientes con enfermedad de Hodgkin las recaídas ocurrieron solo en las zonas previamente afectadas por la enfermedad (LASKY y cols. 1989, PHILLIP y cols. 1990). Resultados preliminares en pacientes con linfoma y afectación medular sometidos a ATSP demuestran un porcentaje de recidivas similar a aquellos que no presentaban infiltración tumoral (KESSINGER y cols. 1990).



---

Resultados similares han sido publicados en otros tumores sólidos. En estos casos, aún cuando la afectación medular sea precoz (neuroblastoma, carcinoma de células pequeñas de pulmón) la presencia de células tumorales en sangre y el riesgo de recaída parece menor que a partir de las células tumorales de médula (HENON y cols. 1991).

Aunque las diferencias en contaminación tumoral de los ATSP frente a los ATMO sigue siendo una cuestión debatida, la mayoría de los datos sugieren que la frecuencia de recaídas no será superior a la de los injertos medulares (KESINGER y cols. 1991). Determinar si ésta es menor viene condicionado por la dificultad existente para distinguir las recidivas originadas a partir del injerto de las células tumorales persistentes en el paciente.

## **OBJETIVOS**

La obtención, criopreservación e infusión de células progenitoras pluripotentes a partir de sangre periférica (ATSP) puede actualmente ser considerada una alternativa terapéutica al trasplante autólogo de médula ósea. La obtención mediante leucaféresis de grandes cantidades de precursores hemopoyéticos, movilizados desde la médula quimioterapia, ha permitido ampliar las indicaciones de trasplante potencialmente curativo a un mayor número de pacientes con enfermedades neoplásicas. Cada vez son mayores los grupos que utilizan esta modalidad de autotrasplante, entre cuyas principales ventajas están: 1. Recolección de precursores hematopoyéticos aún con daño medular por radioterapia previa o por afectación tumoral. 2. Acortamiento de los riesgos relacionados con la aplasia en el periodo postrasplante inmediato, pues la velocidad de reconstitución hemopoyética parece superior al trasplante medular autólogo. 3. No precisa anestesia general.

No obstante, muchos son aún los interrogantes por desvelar en la aplicación del ATSP. ¿Cuál es el mejor indicador de un prendimiento estable?. ¿Cuál es la dosis mínima de estos precursores qué debería recolectarse e infundirse para garantizar un éxito terapéutico?. ¿Cuál es el momento óptimo para iniciar su recolección?. ¿Es posible

la obtención de un injerto medular estable y permanente empleando estas CPSP?. Estas y otras cuestiones han sido planteadas en nuestro estudio en el que esquemáticamente nos propusimos los siguientes objetivos:

- 1.- Determinación de los parámetros de recolección idóneos para obtener los mayores rendimientos de precursores hemopoyéticos mediante leucoféresis en pacientes con hemopatías malignas.
- 2.- Estudio de la relación entre el número de células mononucleares (CMN) en la recolección y el número de CFU-GM obtenidas tras féresis.
- 3.- Cálculo del número mínimo de CFU-GM a infundir necesario para garantizar una recuperación hemopoyética estable.
- 4.- Estudio de la toxicidad y potencial erradicativo antitumoral de los regímenes de acondicionamiento pretransplante.
- 5.- Seguimiento clínico de los pacientes tras ATSP con estudio de parámetros de recuperación en médula ósea y sangre periférica.

## **MATERIAL Y METODOS**

**PACIENTES**

Para la realización de este estudio se han incluido 34 pacientes diagnosticados de leucemia mieloblástica aguda (24 casos), leucemia linfoblástica aguda (cinco casos), linfoma no Hodgkin (un caso), enfermedad de Hodgkin (un caso) y mieloma múltiple (tres casos) a los que se les efectuaron un total de 186 sesiones de citoféresis. Todos los pacientes habían sido diagnosticados o remitidos al Servicio de Hematología del Hospital La Fe entre el uno de Noviembre de 1989 y el 30 de Abril de 1991.

**CRITERIOS DE INCLUSION**

Los criterios para la inclusión de los pacientes en el programa de recolección y autotransplante de CPSP fueron los siguientes:

- Pacientes con LMA sin donante HLA-compatible en primera RC con edad menor o igual a 60 años. Asimismo, se consideró individualmente la inclusión de los pacientes en primera RC pero cuya edad se encontraba entre 60 y 65 años.
- Pacientes con LMA que alcanzaron una segunda RC durante el periodo de estudio, tras recaída de protocolos previos.

- Pacientes con LLA sin donante HLA-compatible en segunda o posterior RC.
- Pacientes con linfomas Hodgkin y no Hodgkin con afectación medular y resistentes a protocolos de quimioterapia convencionales.
- Pacientes con mieloma múltiple y edad inferior a 60 años.

Las diferentes etapas del programa de ATSP se esquematizan en la figura 1.

#### DIAGNOSTICO

El diagnóstico de LMA y LLA se basó en la morfología de las extensiones de sangre periférica y médula ósea al microscopio óptico teñidas con May-Grünwald-Giemsa según los criterios de la clasificación propuesta por el grupo cooperativo FAB (BENNET y cols. 1976). El diagnóstico de enfermedad de Hodgkin y linfoma no Hodgkin, así como su subtipo histológico, se basó en hallazgos anatomopatológicos de muestras de adenopatías obtenidas mediante biopsia extemporánea. El mieloma múltiple se diagnóstico de acuerdo con los criterios del Myeloma Task Force.

El material medular necesario para el examen citomorfológico, así como para la realización de otras técnicas, fue obtenido mediante punción aspirativa sobre mango esternal, siendo ocasionalmente necesaria la

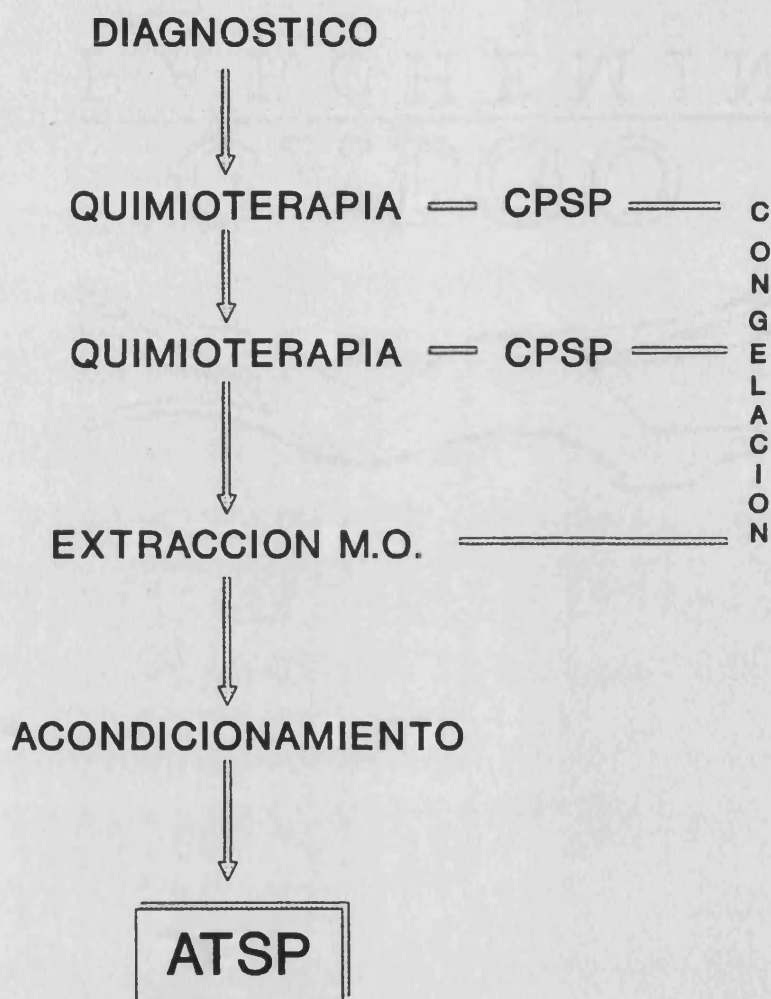


FIGURA 1. PROGRAMA DE ATSP EN PACIENTES CON HEMOPATIAS MALIGNAS.



realización de biopsia ósea sobre cresta ilíaca posterosuperior.

#### DEFINICIONES EMPLEADAS EN EL ESTUDIO

##### 1. Remisión completa.

Los criterios para definir la remisión completa (RC) fueron los establecidos por el Cancer and Acute Leukemia Group B (CALGB, 1974). Estos criterios exigen la normalización hematológica de la médula ósea (menos de un 5% de células leucémicas) y sangre periférica (cifra y recuento porcentual de leucocitos normal) y la ausencia de síntomas o signos atribuidos a infiltración orgánica leucémica.

##### 2. Eficacia o rendimiento de la recolección.

El número total de CMN recolectadas se basa en el volumen del producto y la concentración de las células en el mismo. La eficacia estimada de la recolección puede ser determinada dividiendo el total de células recolectadas por el total estimado de células procesadas. Este último dato se calculó multiplicando el recuento medio de células, basado en el recuento/ $\mu$ L pre y postféresis del paciente, por el volumen total procesado. La eficacia de la recolección se obtuvo empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{\text{CMN/mL} \times \text{volumen (bolsa recolección)}}{\text{CMN/mL paciente (*)} \times \text{volumen procesado}} \times 100$$

(\*) media de CMN y de leucocitos iniciales y finales del proceso.

### 3. Fracaso del injerto.

Los pacientes en los que no se evidenció prendimiento hemopoyético a las tres semanas postransplante se consideraron fracaso del injerto, siendo candidatos a la administración de factores de crecimiento y/o a un transplante autólogo de médula ósea. También se consideró fracaso de prendimiento la aparición de citopenias tras una recuperación hemopoyética inicial.

### 4. Prendimiento incompleto.

Los criterios para considerar un prendimiento del injerto como incompleto fueron la ausencia de, al menos, una de las tres líneas hemopoyéticas en médula ósea a los 30 días postransplante.

### 5. Recidiva.

La recidiva se definió como la reaparición de una infiltración leucémica superior al 5% en médula ósea o la existencia de infiltrado tumoral en cualquier otra localización extrahematológica.

## 6. Duración de la remisión y supervivencia.

Se definió la duración de la remisión como el intervalo entre la fecha en que alcanzó RC y la fecha de recaída. La duración de la supervivencia fue definida por el tiempo transcurrido desde el día del trasplante (día 0) y la fecha de muerte. Se consideró como supervivencia libre de enfermedad (SLE), el tiempo transcurrido desde la fecha del autotrasplante hasta la recaída o la muerte.

## RECOLECCION DE CPSP

### 1. Momento de la recolección.

Se obtuvo consentimiento por escrito de los pacientes en todos los casos antes del inicio de la recolección. En los pacientes con leucemia mieloblástica aguda, se realizó tras finalizar la quimioterapia de inducción y consolidación (Tablas 1-3). En un paciente diagnosticado de LMA-M3 se empleó el protocolo quimioterápico diseñado por ARLIN (ARLIN y cols. 1984) en segunda RC (Tabla 4). En el resto de pacientes, la recolección se efectuó tras dos ciclos de tratamiento quimioterápico, siguiendo los protocolos que se muestran en las tablas 5 y 6. El comienzo de las citoféresis vino determinado por la recuperación de leucocitos en sangre periférica ( $>1.000/\text{mm}^3$ ) siempre que existiese una proporción

significativa de CMN, como expresión de recuperación hemoperiférica (>30%) y si la situación clínica del enfermo lo permitía. Antes de iniciar la recolección se efectuó hemograma completo y recuento diferencial mediante un contador automatizado Coulter S-plus (Coulter Electronics Inc., Florida, USA) o un contador Technicon H-1 (Technicon Instruments Corporation, Tarrytown NY, USA), confirmándose la fórmula leucocitaria sistemáticamente mediante conteo diferencial realizado manualmente y que incluía un mínimo de 200 células. En los casos en que no se hizo tras la inducción a la remisión, se realizó punción medular previa a la recolección para confirmar la obtención de RC.

En los pacientes en que no pudieron realizarse las citaféresis tras alguno de los ciclos de tratamiento por complicaciones clínicas o técnicas, se administró un ciclo adicional de quimioterapia según esquema COAP para inducir la movilización de las CPSP tras la aplasia postquimioterápica (Tabla 7).

## 2. Técnica de recolección y separadores empleados.

Los sistemas de aféresis que emplean fuerza centrífuga dependen de la diferente densidad de los componentes sanguíneos para lograr la separación de la fracción deseada. El resto de la sangre es reinfundida al paciente bien a través de un sistema de flujo continuo o discontinuo. Todos estos sistemas requieren el empleo de equipos desechables

compuestos de bolsas de recolección y líneas de infusión y recolección de componentes interconectadas y estériles. En todos los casos se empleó un anticoagulante (heparina o citrato) con una proporción establecida con la sangre total conforme entra en el sistema para evitar activación de la coagulación y la formación de trombos que alterarían el proceso de recolección. En general, la sangre es bombeada a un contenedor situado en el interior de la centrífuga donde se produce la separación de los componentes. Una vez el elemento deseado ha sido recolectado, los hematíes se mezclan con los demás elementos reinfundiéndose al enfermo.

A los enfermos incluidos en el protocolo se les efectuaron 3-7 citaféresis (una diaria durante 3-7 días consecutivos) por paciente tras cada uno de los ciclos de quimioterapia. Los separadores empleados fueron Fenwal CS-3000 y CS-3000 plus (Fenwal Laboratories, Deerfield, Illinois, USA) y Cobe Spectra (Cobe Apheresis system, Cobe Laboratories Inc., Lakewood, Colorado).

### 2.1 Fenwal CS-3000 y 3000 plus.

Estos separadores de células sanguíneas (figura 2) son aparatos centrifugadores autónomos de flujo continuo que fraccionan la sangre entera en alguno de sus componentes. Los componentes del separador incluyen un centrifugador, dos bombas peristálticas y un sistema de controles y monitorización por un microordenador. La recolección de componentes sanguíneos específicos puede ser realizada y monitorizada de forma automática, dado que se almacena en la

memoria de estado sólido del separador un programa para cada procedimiento. El separador está provisto de dos modos operativos: automático y manual. Durante la operación automática, todas las funciones son controladas por un microordenador, salvo en situaciones en las que se requiere la intervención del operador. La comunicación entre el separador y el operador se lleva a cabo mediante los controles indicadores situados en la consola. Los componentes son recolectados en un equipo de aféresis estéril y desechable. Este equipo incluye un sistema de tubos estériles de plástico, envases y conectores, donde los componentes sanguíneos son separados por centrifugación según su diferente densidad. Varios sistemas de monitorización son continuamente comprobados con el fin de detectar situaciones anómalas o potencialmente peligrosas. Una combinación de lectores digitales, lámparas indicadoras y alarmas sonoras mantienen al operador informado del estado del aparato y cualquier anomalía. Si no se efectúa la acción apropiada para corregir una anomalía dentro de un tiempo determinado, el separador interrumpe el procedimiento y el paciente queda aislado del sistema.

Como ya se ha mencionado, estos separadores están diseñados para realizar la centrifugación de un flujo continuo de sangre anticoagulada. Se empleó una solución salina estéril para purgar el sistema tras su instalación en el separador y antes de iniciar el proceso de recolección. La sangre total del paciente se mezcla con el anticoagulante

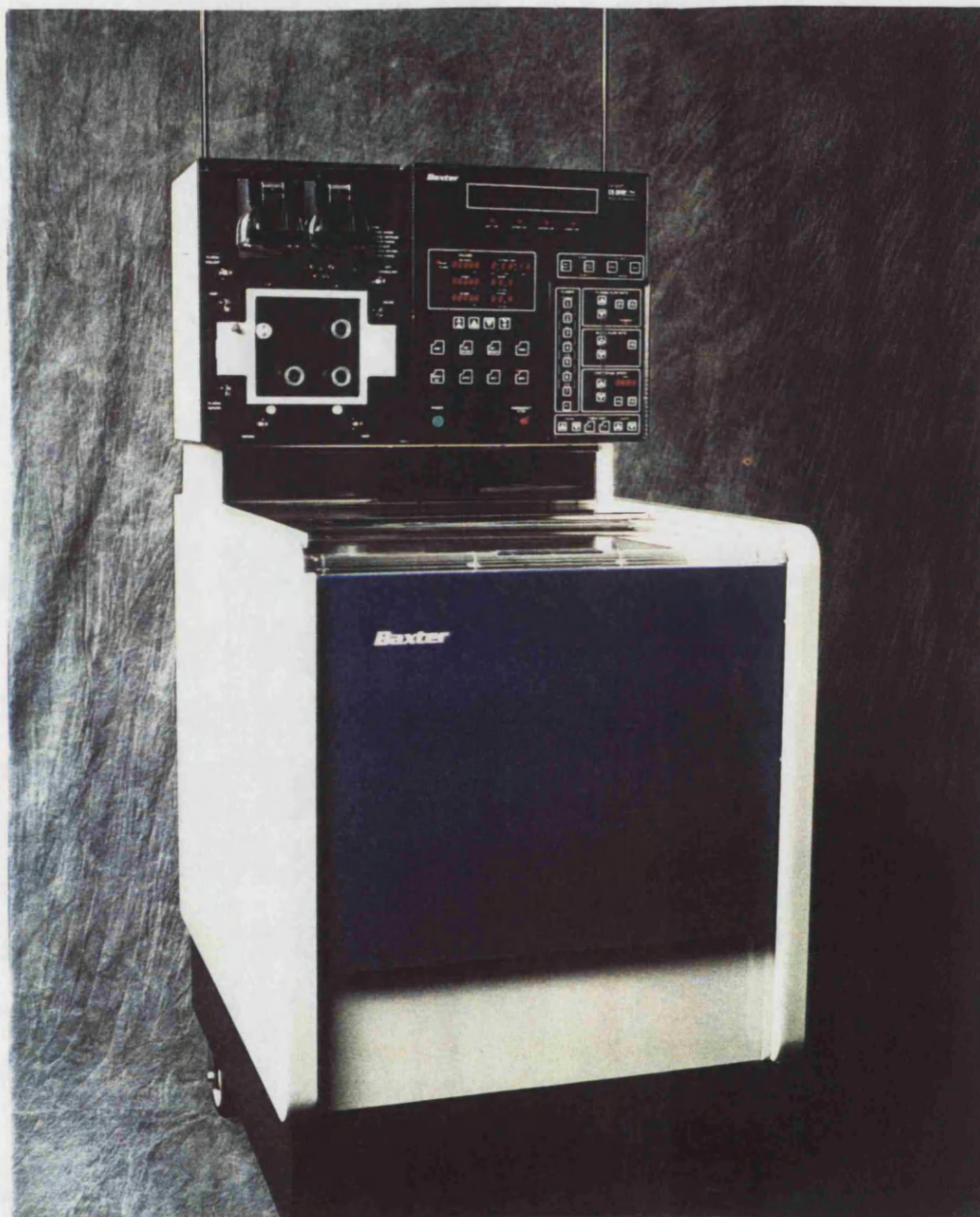


Figura 2. Separador de flujo continuo Fenwal CS-3000.

y es bombeada hasta el envase de separación dentro del centrifugador. En este envase, la sangre total anticoagulada es separada en dos componentes: plasma rico en componentes (PRC) y concentrado de hematíes (CH). El PRC es bombeado del envase de separación al de recolección por la bomba de plasma. Los componentes presentes en el PRC, en nuestro caso las CMN, se concentran en el envase de recolección y el plasma pobre en componentes (PPC) sale del envase. El PPC puede ser recolectado en una bolsa de transferencia o, combinado con el CH del envase de separación, devuelto al paciente. El equipo de recolección empleado para la obtención de CMN se muestra en la figura 3.

Los programas empleados en nuestro estudio fueron el 1 (linfóferesis) modificado ó 1 especial según que el separador utilizado fuese el CS-3000 ó CS-3000 plus respectivamente (Tabla 8). Las modificaciones efectuadas en el programa estándar consistieron en la introducción del hematocrito real del paciente y la colocación del detector de línea base a 1.100 con lo que los "spill-over" se efectuaban aproximadamente cada 4-4,5 minutos.

Las CPSP recolectadas se transfieren a una bolsa de recolección de granulocitos (Baxter). En ningún caso se emplearon agentes para facilitar la sedimentación. La duración media de cada sesión fue de 3 horas 30 minutos. El procedimiento obtuvo un volumen medio en bolsa de recolección de 200 mL.



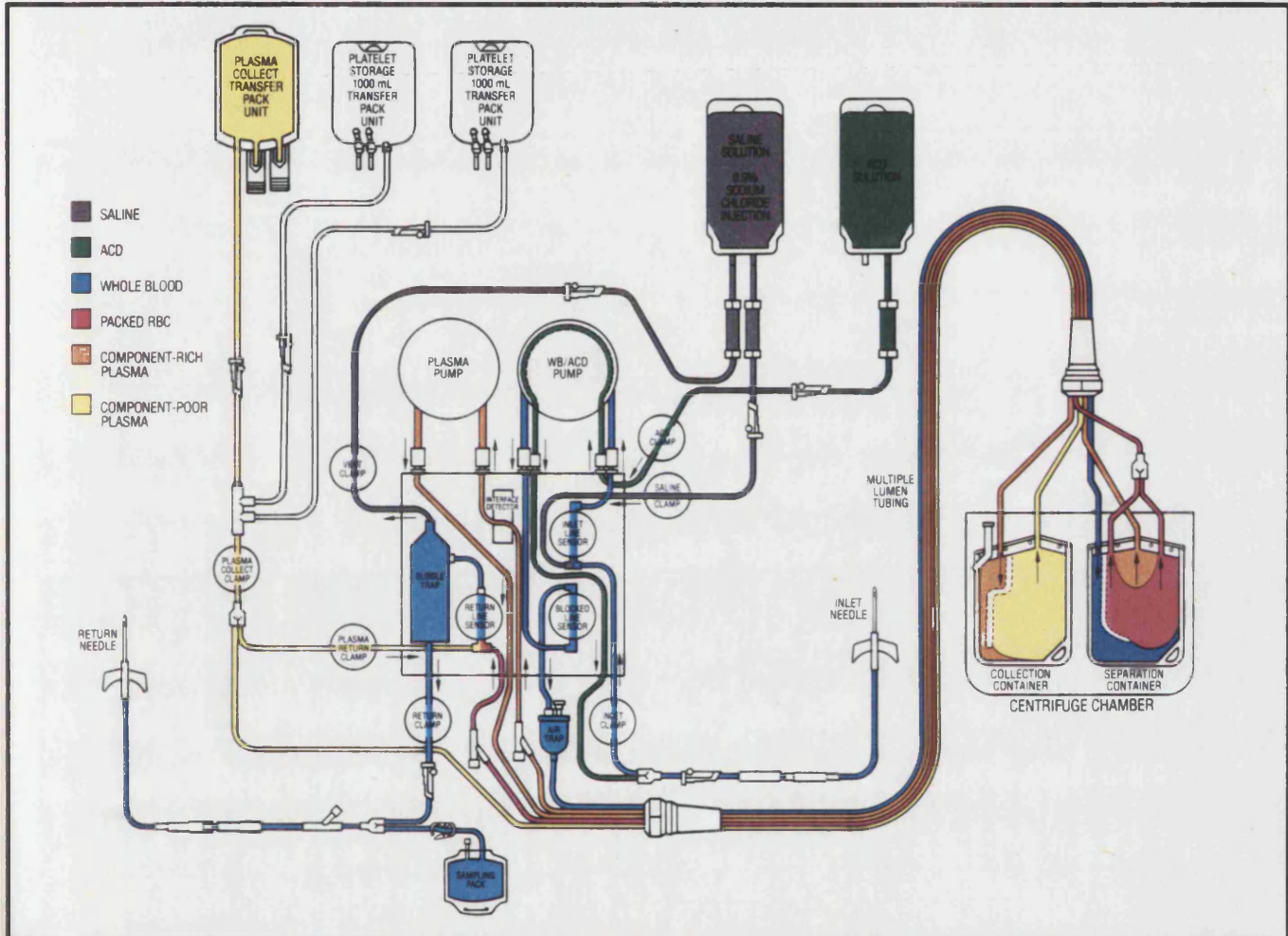


Figura 3. Fenwal CS-3000. Equipo de recolección de CPSP.

## 2.2. Cobe Spectra.

Otro separador de flujo continuo empleado fue el Cobe Spectra (figura 4). En éste, la sangre total obtenida del paciente y sometida a anticoagulación es bombeada a la centrifuga donde se encuentra un dispositivo en forma de cinturón, siendo separada en sus diversos componentes según su densidad; los hematíes ocupan la parte exterior, los leucocitos la zona media y el plasma con alto contenido en plaquetas la interior (figura 5). La interfase hematíes-plasma se mantiene constante debido al equilibrio de las caídas de presión junto con la densidad y viscosidad de los hematíes y plasma circulando a través de los tubos de hematíes y de control. Los leucocitos son retirados del canal por un tubo para ello, mientras que el plasma y las plaquetas salen a través del tubo de plasma. Este separador dispone también de un panel de control ubicado en su parte superior y que ofrece información sobre las diversas alarmas así como solicita los datos necesarios del paciente que va a ser sometido a féresis para cálculo de diversas variables (volumen plasmático, velocidad de flujo, velocidad de centrifuga y tiempo de duración del procedimiento). Al igual que el separador CS-3000, puede operar en control automático y manual. Las principales características del programa de recolección empleado (leucocitos) se muestran en la Tabla 9.



Figura4. Separador de flujo continuo. Cobe Spectra.



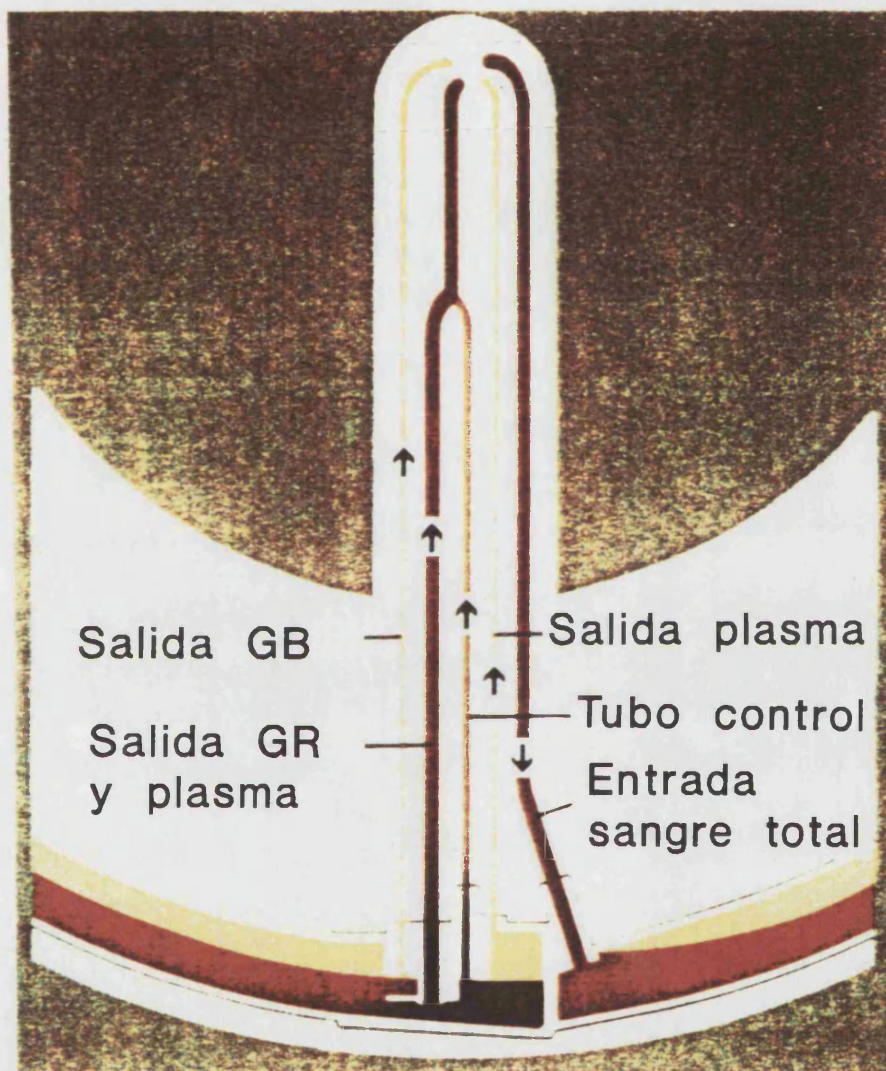


Figura 5. Cobe Spectra. Canal de recolección de CMN.

### 2.3. Haemonetics V-50-I.

El separador de flujo discontinuo Haemonetics V-50-I (Haemonetics Corporation, Braintree, Massachussets, USA) se empleó solo en tres ocasiones por problemas de índole técnico en los otros separadores. Este procesador es una máquina versátil, de fácil manejo, que permite la recogida automatizada de componentes sanguíneos. Como los de flujo continuo, el sistema extrae la sangre completa del paciente y una vez mezclada con el anticoagulante la separa en plasma y sus componentes, recogiendo el producto deseado (en este caso las CMN) y restituyendo los elementos no recogidos. Lleva incorporados sistemas de monitorización de seguridad para detectar restricciones u obstrucciones del flujo, detección de aire y velocidad del centrifugado. Botones de fácil operación permiten al operador anular el ciclo automático en cualquier momento del procedimiento. En nuestro caso, las CMN recolectadas se transferían a una bolsa de transferencia con una capacidad de 600 mL. En los casos en los que se empleó este separador, el flujo depurado fue también el doble de la volemia del paciente, con una duración media de 3 horas 30 minutos. Las características de recolección en la V-50-I se muestran en la Tabla 10.

La vía empleada para entrada al sistema fue en la mayoría de los casos a través de una aguja de fístula venosa de 16-GA y con un catéter de 30 cm. de longitud, suministrado por los laboratorios Baxter (Baxter, Trieste) y

situado en fosa antecubital, mientras que la utilizada como sistema de retorno fue un catéter de una luz colocado en aurícula derecha (Quinton Instrument Company, Seattle, USA). El anticoagulante empleado en todas las recolecciones fue el ACD fórmula A incluido en el equipo de recolección Fenwal o de Laboratorios Grifols (Barcelona, España).

Se transfundieron plaquetas de manera profiláctica antes de la recolección en todos los pacientes con cifras inferiores a  $20 \times 10^9 / L$ . Asimismo, se procedió a la administración de concentrado de hematíes antes de la recolección en aquellos pacientes que presentaron un hematocrito inferior al 30%.

### 3. Estudios de citofluorometría.

En todos los ciclos de recolección se procedió al estudio inmunofenotípico de las CMN. Las células obtenidas se suspendieron en Lymphoprep (Sodium metrizoato 9,6%, Ficoll solution 5,6%, densidad  $1077 \pm 0,001$ , de Nyegaard & Co. AS. Oslo, Norway), en una proporción de Lymphoprep/sangre de 3/4. Tras centrifugación, se resuspendieron en medio de cultivo Medium-199 (M-199, Flow laboratory, Irvine, Scotland) y se procedió a su lavado y contaje. Las suspensiones se mantuvieron a  $4^{\circ} C$  durante su empleo, congelándose parte de las células para estudios posteriores. El análisis de los marcadores de superficie se realizó en un citómetro FACSCAN (Becton Dickinson, Mountain View,

California). Los AcMo empleados fueron los siguientes: CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD19, CD20, CD34 y anti HLA-DR. La especificidad y procedencia de los mismos se muestra en la Tabla 11. El valor absoluto de células CD34+ presentes entre las células recolectadas se expresó en número de células  $\times 10^6$ /Kg y se calculó a partir de la cifra de leucocitos recolectados ( $\times 10^9$ /L), el volumen en bolsa de recolección (en mL), el porcentaje de células CD34+ en la muestra y el peso del paciente según la siguiente fórmula:

$$\text{células CD34+} = \frac{\text{Leuc recolectados} \times \text{vol en bolsa} \times \% \text{ CD34+}}{\text{peso del enfermo (kg)}}$$

## PROCESAMIENTO Y CONGELACION CELULAR

### 1. Purificación de CMN.

Tras la adición de anticoagulante (ACD-A) hasta una concentración final del 7%, se procedió a la centrifugación del material recolectado a 400 g durante 13 minutos, con el fin de obtener en el menor volumen posible un ajuste máximo de  $100 \times 10^9$  células/L.

### 2. Cultivos celulares.

En todos los casos se realizaron estudios de precursores celulares granulomonocíticos (CFU-GM) en muestras pre y postcongelación mediante técnica de Iscove-Metilcelulosa (ISCOVE y cols. 1971) con medio condicionante placentario como fuente de factor estimulante

de colonias. Previamente se separaron dos alícuotas para controles posteriores.

La preparación del cultivo se realizó del siguiente modo:

Ajustando a la viabilidad, se obtiene de la muestra a procesar el volumen necesario para coger  $5 \times 10^5$  células. Una vez homogeneizado y con jeringa de insulina desechable sin aguja se distribuyó 1 mL en cada una de las dos placas Petri de 35 mm (Nunc, Kamstrup, Roskilde, Dinamarca), sembrándose  $2 \times 10^5$  células por placa. Todo este proceso se llevó a cabo en condiciones de esterilidad bajo cámara de flujo laminar (Telstar SA, Tarrasa, España). Las dos placas de 35 mm por cultivo se situaban junto a una tercera conteniendo solo agua estéril, dentro de una placa de 10 cm. Para el cultivo se empleó estufa (Forma Scientific Inc, Marietta, Ohio, USA) con unas condiciones de atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> y una temperatura de 37° C. La lectura y contaje se realizaron a los 10 días. El resultado se expresó como número de colonias por cada  $2 \times 10^5$  células viables. Todas las lecturas se hicieron por duplicado, considerándose colonias los grupos celulares con 50 ó más elementos, siendo el valor final la media del obtenido en las dos placas.

Con el número de células inicial y ajustando la viabilidad, se calculó el número total de CFU-GM según la fórmula siguiente:



$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de colonias x células totales en bolsa x } 10^5}{2 \times 10^5}$$

El resultado obtenido, dividido por el peso del paciente, se expresó como número de CFU-GM  $\times 10^4$  /kg.

## CRIOPRESERVACION

### 1. Congelación.

La preparación precongelación de CPSP se efectuó con una solución compuesta por albúmina (10%), DMSO al 20% (Laboratorios Bruneau, París, France) y medio de cultivo TC-199 al 30% (Biological Industries, Israel). La proporción entre las CMN y la solución de criopreservación fue volumen a volumen a una concentración final de 10% de DMSO y 5% de albúmina. La solución de congelación se añadió agitando continuamente la bolsa y en un tiempo máximo de 5 minutos. Se utilizaron bolsas Kapton-Teflon DF-7003 y DF-1000 (Gambro, GmbH & Co KG, Hechingen, RFA) resistentes a temperatura de nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}$  C) con un volumen final máximo de 100-150 mL. La suspensión celular se mantiene en baño de hielo. Una vez acabado el proceso se procedió al sellaje de las bolsas y a su introducción en el soporte metálico de la cámara de congelar. La congelación se

realizó en un congelador Planer-Biomed Kryo-10 (Planer Products Ltd, Sunbury, UK) con un descenso térmico de  $-1^{\circ}$  C/min hasta alcanzar  $-60^{\circ}$  C y a  $-5^{\circ}$  C/min hasta  $-120^{\circ}$  C. El almacenamiento hasta su utilización se realizó en recipientes criobiológicos Taylor Wharton 27K (Cryogenics Customer Service, IN) con una capacidad de 610 litros de nitrógeno en fase líquida. Siempre se preparó simultáneamente una bolsa idéntica pero sin células que sirvió como testigo de la congelación.

## 2. Estudio de viabilidad celular.

Los controles de viabilidad postcriopreservación se realizaron sobre alícuotas descongeladas de forma rápida en baño a  $37^{\circ}$  C, utilizando la técnica de naranja de acridina-bromuro de etidio. En condiciones de oscuridad se mezclaron empleando pipetas automáticas, volumen a volumen 20  $\mu$ L de la solución celular y 20  $\mu$ L de naranja de acridina, homogeneizándose y dispensando una gota en un portaobjetos para su lectura al microscopio Zeiss de fluorescencia (Carl Zeiss, Oberkochen, RFA).

## EXTRACCION Y CONGELACION DE MEDULA OSEA AUTOLOGA

En los pacientes en programa de recolección y ATSP, al acabar último ciclo de recogida de progenitores y antes del autotransplante, se recolectó médula ósea autóloga mediante

punciones repetidas en crestas ilíacas posterosuperiores bajo anestesia general, según técnica descrita por THOMAS y cols. (1970). La recolección medular se efectuó como medida de seguridad para su empleo en caso de fracaso del injerto o recidiva.

#### 1. Purificación y congelación medular.

El material medular (800-1.000 mL) fue filtrado y depleccionado de hematíes y de la mayoría de los PMN mediante gradiente de centrifugación con Ficoll-metrizoato con un separador IBM-Cobe 2991 (Cobe Laboratories, Inc. Lakewood, CO) según técnica descrita por GILMORE y cols. (1982). La solución de congelación fue la misma que la empleada para las CPSP. La concentración final por bolsa fue inferior a  $40 \times 10^6$  /L con un volumen máximo de 150 mL. El resto del proceso de criopreservación y almacenamiento fue similar al descrito para las CPSP.

### PROCEDIMIENTO DE ADMINISTRACION DE CPSP

#### 1. Transporte.

El transporte de las células recolectadas hasta la planta hospitalaria para su posterior infusión se efectuó en un recipiente criogénico tipo Dewar DF-10 (Wessington Cryogenics, UK) de 10 litros de capacidad.

## 2. Descongelación e infusión.

El procedimiento de descongelación e infusión se inició sistemáticamente a las 48 horas de la finalizar el acondicionamiento. La descongelación se realizó en baño maría a 37° C en 1-2 minutos en agitación, retirándose la unidad del baño en cuanto se observaba la ausencia de fragmentos de hielo, para evitar un calentamiento excesivo. La infusión se realizó durante uno o dos días consecutivos en función del volumen de líquido a administrar. La perfusión se realizó con equipo de gotero sin filtro con jeringa de 50 mL por vía venosa central a una velocidad media de 10 mL/min. Una vez la bolsa vacía, se efectuó lavado con 50 mL de solución salina estéril con intención de arrastrar las CMN que hubieran podido quedar en sistema y bolsa. El tiempo máximo de duración del proceso fue de 15 minutos para evitar contactos prolongados de los precursores con el DMSO y la consiguiente destrucción celular (TO y cols. 1984, KESSINGER y cols. 1988). Previo a la infusión se administró furosemida por vía i.v. para inducir hiperdiuresis y evitar la sobrecarga hídrica. También se administró un antihistamínico (difenhidramina) para minimizar las consecuencias de la liberación de histamina inducida por el DMSO y la destrucción de granulocitos maduros. El intervalo transcurrido entre la infusión de bolsas fue de 3-4 horas. Tanto durante, como tras la administración de las CMN se registró la aparición de

efectos secundarios especialmente por el DMSO (fiebre, escalofríos, disnea, rash, coluria, etc.).

En el momento de la descongelación, y previo a la infusión, se tomó muestra para estudio de CFU-GM. Esta muestra se añadió a la solución de descongelación (18 mL) preparada inmediatamente antes en cámara de flujo laminar y compuesta por suero AB (20%), medio Iscove (70%) (GIBCO) y heparina (0,02 mL).

#### **AUTOTRANSPLANTE DE CPSP**

Hasta la actualidad se han efectuado un total de 22 autotransplantes de CPSP (ATSP), 17 en pacientes diagnosticados de LMA, cuatro en LLA y un paciente con enfermedad de Hodgkin. En todos los casos el procedimiento de infusión de CPSP, así como las medidas generales de cuidado de los enfermos han sido idénticas.

##### **1. Medidas generales.**

Como todo enfermo que va a ser sometido a transplante de médula, los pacientes ingresaron para tratamiento de acondicionamiento en habitaciones individuales o dobles sin medidas de aislamiento riguroso. Antes de iniciar el acondicionamiento, se garantizó la implantación de un catéter venoso central. El catéter se empleó para la administración de soluciones intravenosas, transfusiones,

citostáticos, antibióticos, alimentación parenteral, etc., y para obtener muestras de sangre para estudios analíticos y bacteriológicos. Se realizaron controles analíticos de hemograma con recuento diferencial y de bioquímica sérica a días alternos.

## 2. Profilaxis de la cistitis hemorrágica.

Se realizó profilaxis de la cistitis hemorrágica con la administración de mesna (160% de la dosis de ciclofosfamida [Cy]) fraccionada en dosis partes y administrada simultáneamente a la infusión de Cy y a las 3, 6 y 9 horas de finalizar ésta. Se realizó evacuación horaria de la vejiga sin alcalinización urinaria.

## 3. Acondicionamiento pretransplante.

La quimioterapia de acondicionamiento administrada en 19 pacientes consistió en Cy 50 mg/kg de peso corporal ideal [PCI]/día i.v. durante cuatro días (dosis total 200 mg/kg) y busulfan (Bu) p.o. 4 mg/kg PCI/día, cuatro días (dosis total 16 mg/kg). Dada la alta dosis de Bu administrada se efectuó profilaxis antiepiléptica con fenitoína (300 mg/día p.o.) desde 24 horas antes de iniciar el acondicionamiento hasta 48 horas después de finalizarlo. Los regímenes de acondicionamiento administrados en los pacientes restantes se muestran en la Tabla 12.

#### 4. Soporte transfusional.

Se procuró mantener el nivel de hemoglobina por encima de 8-10 g/dL con transfusiones de concentrados de hematíes. En caso de reacciones febriles no hemolíticas por los hemoderivados se emplearon corticoides y/o antihistamínicos i.v., así como empleo de filtros desleucotizadores PL-100 (Baxter).

La administración de plaquetas se realizó de manera profiláctica siempre que el recuento de éstas fuese menor de  $20 \times 10^9 /L$ , o con trombopenias menos severas, cuando existía un estado infeccioso concomitante o había hemorragias con entidad suficiente para reforzar las medidas de soporte transfusional. Se recurrió al empleo de plaquetas de donante único obtenidas mediante plaquetoféresis (Fenwal CS-3000) en caso de refractariedad a las plaquetas y la existencia de diátesis hemorrágica severa. Todos los hemoderivados fueron irradiados para evitar la aparición de reacciones injerto contra huesped, con una dosis total de 1.500 rads (15 Gy).

#### 5. Profilaxis antiinfecciosa.

Desde el inicio del acondicionamiento se realizó sistemáticamente profilaxis antifúngica con solución oral de nistatina, así como profilaxis antibacteriana con ciprofloxacino p.o. (500 mg/12 h), y profilaxis de las infecciones por virus herpes administrando aciclovir p.o. (450 mg/8 h) o i.v. (400 mg/12 h) desde una semana

pretransplante hasta seis meses post ATSP. Se realizó profilaxis anti-citomegalovirus con gammaglobulina específica hiperinmune a dosis de 1 mL/kg i.v. los días -7, +13, +33, +53, +73 y +93. También se procedió a la prevención de la infección por Pneumocystis carinii mediante la administración oral de trimetoprim-sulfametoxazol (160 y 400 mg/día respectivamente). Una vez finalizado el acondicionamiento el paciente era trasladado a habitaciones individuales con medidas de aislamiento inverso (mascarilla, guantes, bata estéril, etc).

La temperatura corporal se registró cuatro veces al día y siempre que se sospechara una elevación térmica. En caso de fiebre superior a 38,5° C sin relación con la administración de fármacos o transfusiones de hemoderivados se instauró antibioterapia empírica i.v. con la asociación de un aminoglucósido y un betalactámico. Previamente se procedió a la toma de tres hemocultivos seriados. Se procuró también disponer de una radiografía de tórax dentro de las siguientes 24 horas. Los estudios bacteriológicos se continuaban efectuando periódicamente, siendo especialmente rigurosos para efectuar nuevos hemocultivos ante cada pico febril. Se realizaron cultivos microbiológicos de otros especímenes (orina, heces, esputos, etc) de forma rutinaria y también de las posibles focalidades (líquido pleural, ascítico, lavado broncoalveolar, etc) cuando se consideró conveniente.



La actitud seguida de forma general ante la evolución de la infección fue la siguiente: en caso de no lograrse la apirexia en las primeras 72 horas, se modificó empíricamente la antibioterapia o se adaptó, según la sensibilidad "in vitro", cuando la infección fue documentada microbiológicamente. Ante la persistencia del síndrome febril o ante la sospecha clínica o documentación de una micosis sistémica se añadió anfotericina B intravenosa. La administración de antimicrobianos se mantuvo de 7 a 15 días tras alcanzar apirexia, dependiendo del tipo de infección y de la recuperación o no de la neutropenia.

#### 6. Tratamiento de soporte.

Ante la aparición de mucositis severa que impidiese la deglución, una anorexia prolongada o un balance nitrogenado negativo se procedió a la administración de nutrición parenteral. El contenido calórico y de suplementos (insulina, iones, productos nitrogenados, etc.) vino determinado por las alteraciones metabólicas, y la duración de su administración dependió de los requerimientos de cada paciente.

La pauta analgésica habitual consistió en la combinación de fármacos no opiáceos con antidepresivos tricíclicos por vía oral o endovenosa. La aparición de mucositis severa (grado II o mayor) se trató con morfina i.v. a demanda controlada por el propio paciente mediante bomba de infusión.

### 7. Evaluación de la toxicidad.

El grado de toxicidad del acondicionamiento se gradó de acuerdo con los criterios de SCOTT y cols. (1988) que se muestran en la Tabla 13. La toxicidad se evaluó los días 0, 7, 14 y 28 (y en el día 100 para la toxicidad pulmonar). Se consideró grado IV la que ocasionó la muerte del paciente.

Se consideró el diagnóstico de Enfermedad venooclusiva hepática (EVOH) ante la presencia de al menos dos de los siguientes síntomas: ictericia, hepatomegalia con hepatalgia, ascitis y aumento de peso en ausencia de cualquier otra causa.

### 8. Evaluación de prendimiento.

Se consideró día 0 el día de infusión de las CPSP. Se efectuó un primer control medular mediante aspiración realizada sobre mango esternal entre los días +12 y +14. Los estudios medulares posteriores fueron indicados por los parámetros de recuperación en sangre periférica. Se consideró prendimiento completo o incompleto se aplicó según los criterios expuestos en la página 42.

---

**TRATAMIENTO DE LOS FRACASOS DE PRENDIMIENTO Y RECAIDAS****1. Fracasos de prendimiento.**

En los pacientes en los que no se evidenció recuperación hemoperiférica o apareció pancitopenia tras una recuperación inicial de los parámetros hemoperiféricos, se les infundió la médula ósea de rescate sin acondicionamiento previo.

**2. Recaídas.**

Los pacientes que desarrollaron una recaída medular postransplante fueron sometidos a TAMO a partir de la médula ósea previamente en RC almacenada en nitrógeno líquido.

**METODOS ESTADISTICOS**

Los datos clínicos y biológicos se recogieron en formularios de diseño adecuado para su posterior tratamiento informático. Se anotaron más de 150 características de cada paciente. Los datos analíticos se recogieron antes y después de cada sesión de recolección, así como los valores en la bolsa de recolección y los parámetros del separador empleado. Se anotaron los datos clínicos, analíticos y de otras exploraciones complementarias pretransplante así como los datos evolutivos.

### 1. Mecanización informática de los datos.

Para facilitar el análisis estadístico, la información recogida en las fichas fue trasladada a un soporte magnético de un ordenador personal mediante un programa gestor de base de datos. El soporte físico (hardware) fue un ordenador IBM PC AT y la impresora empleada una Panasonic KX-P4450.

### 2. Métodos estadísticos.

El análisis estadístico incluyó una fase descriptiva con cálculo de distintos estadísticos de distribución (mediana, media, intervalo, desviación típica) y de la función de supervivencia (curvas actuariales de duración de la supervivencia). Los distintos estadísticos de distribución fueron obtenidos mediante fórmulas estándar. La duración de la remisión, supervivencia y supervivencia libre de enfermedad (SLE) se analizó mediante curvas de supervivencia de KAPLAN y MEIER (1958). La probabilidad de recuperación de PMN y plaquetas fue analizada también de forma actuarial.

### 3. Soporte lógico (software).

Para la realización de los diferentes estudios estadísticos se emplearon los siguientes programas:

- Gestor de base de datos del paquete integrado Open Acces II Plus, versión 1988, Software Products International.

---

- BioMedical Data Package (BMDP-PC90) de la UCLA (DIXON 1983) del que usaron los siguientes programas:

DM: Data Manager. Lectura de datos contenidos en Open Acces y creación de base de datos con formato BMDP para su lectura con los restantes programas BMDP.

4F: Two-way tables. Prueba de  $X^2$  con o sin corrección de Yates. Estadística descriptiva y comparación de proporciones.

1L: Life tables and survivor functions. Curvas actuariales según Kaplan y Meier. Pruebas log-rank (Breslow, Mantel-Cox, Tarone-Ware y de tendencia).

3D: t tests. Coeficiente de correlación r de Spearman y pruebas de t de Student y U de Mann-Whitney. Estudio de correlación y comparación de medias y ordenamiento numérico de dos grupos.

TABLA 1. PROTOCOLOS TERAPEUTICOS. 6-LAM-87

Inducción a la remisión:

DNR	60 mg/m <sup>2</sup> /día x 3
ara-C	200 mg/m <sup>2</sup> /día x 7

Consolidación:

DNR	60 mg/m <sup>2</sup> /día x 3
ara-C	200 mg/m <sup>2</sup> /día x 7

TABLA 2. PROTOCOLOS TERAPEUTICOS. 7-LAM-88

Inducción a la remisión:

Mitoxantrone	10 mg/m <sup>2</sup> /día x 3
ara-C	150 mg/m <sup>2</sup> /día x 7

Terapia postremisión: Dos ciclos

1º ara-C	500 mg/m <sup>2</sup> /12 h días 1 a 4
Daunoblastina	30 mg/m <sup>2</sup> /día días 5 a 7
2º Mitoxantrone	10 mg/m <sup>2</sup> /día x3
ara-C	150 mg/m <sup>2</sup> /día x7

---

**TABLA 3. PROTOCOLOS TERAPEUTICOS. 2-LAP-83**


---

Inducción a la remisión:

DNR	2 mg/kg/día x 4-6
-----	-------------------

Consolidación:

ADR	45 mg/m <sup>2</sup> /días 1 y 7
6-TG	200 mg/m <sup>2</sup> /d p.o. días 1 a 7
ara-C	150 mg/m <sup>2</sup> /día IV (i.c.) días 1 a 7

---



---

**TABLA 4. PROTOCOLOS TERAPEUTICOS. ATA**


---

Inducción a la remisión:

Ara-C	200 mg/m <sup>2</sup> /día x 5
6-TG	200 mg/m <sup>2</sup> /día p.o. x 5
Amsacrine	200 mg/m <sup>2</sup> /día x 3

Consolidación:

Ara-C	200 mg/m <sup>2</sup> /día x 4
6-TG	200 mg/m <sup>2</sup> /día p.o. x 4
Amsacrine	200 mg/m <sup>2</sup> /día x 2

---

TABLA 5. PROTOCOLOS TERAPEUTICOS. R5-LAL-84

Inducción a la remisión:

VCR	1 mg/m <sup>2</sup> días 1 y 15
MTX	225 mg/m <sup>2</sup> días 1 y 15
L-Asp	20.000 U/m <sup>2</sup> días 2, 4, 16 y 18
ADR	30 mg/m <sup>2</sup> días 8 y 22
VP-16	60 mg/m <sup>2</sup> días 8 y 22
Pred	150 mg/m <sup>2</sup> p.o. días 1 a 22 Reducción progresiva hasta día 34
Ac. fólico	10 mg/m <sup>2</sup> i.m. a las 24, 30, 36, 42 y 48 h de la infusión de MTX.

Consolidación:

VCR	1 mg/m <sup>2</sup> día 1
MTX	225 mg/m <sup>2</sup> día 1
L-Asp	20.000 U/m <sup>2</sup> días 2 y 4
ADR	30 mg/m <sup>2</sup> días 8 y 25
Cy	600 mg/m <sup>2</sup> día 8 y 1200 mg/m <sup>2</sup> día 25
VP-16	60 mg/m <sup>2</sup> día 8
Pred	150 mg/m <sup>2</sup> p.o. días 1 a 8 Reducción progresiva hasta suspender
VM-26	150 mg/m <sup>2</sup> días 22 y 24
Ara-C	300 mg/m <sup>2</sup> días 22 y 24
Ac. fólico	10 mg/m <sup>2</sup> i.m. a las 24, 30, 36, 42 y 48 h de la infusión de MTX.



TABLA 6. PROTOCOLOS TERAPEUTICOS. LINFOMAS REFRACTARIOS. MIME

---

Me-GAG	500 mg/m <sup>2</sup> días 1 y 14
Ifosfamida	1 g/m <sup>2</sup> /día x 5
MTX	30 mg/m <sup>2</sup> día 3
VP-16	100 mg/m <sup>2</sup> /día x 3

---

TABLA 7. PROTOCOLOS TERAPEUTICOS. COAP

---

Cy	600 mg/m <sup>2</sup> día 1
VCR	1,5 mg/m <sup>2</sup> día 1
Ara-C	100 mg/m <sup>2</sup> s.c. x 5
Pred	100 mg/m <sup>2</sup> p.o. x 5

---

TABLA 8. CS-3000 y 3000 PLUS. PARAMETROS DE RECOLECCION

---

Programa	1 modificado 1 especial (plus)
Velocidad de flujo (mL/min)	45-50
Velocidad angular (rpm)	1.400
Volumen procesado (litros)	7-10 (según volemia)
Duración	3 horas 30 min.
ACD	10:1
Volumen recolectado (mL)	200
Número de sesiones	158

---

TABLA 9. COBE SPECTRA. PARAMETROS DE RECOLECCION

---

Programa	Leucocitos
Velocidad de flujo (mL/min)	50-60
Velocidad angular (rpm)	800-1.000
Volumen procesado (litros)	7-10 (según volemia)
Duración	3 horas
ACD	8:1
Volumen recolectado (mL)	400
Número de sesiones	25

---

TABLA 10. HAEMONETICS V-50-I. PARAMETROS DE RECOLECCION.

---

Programa	Linfoféresis
Velocidad de flujo (mL/min)	40-50
Volumen procesado (litros)	7-10 (según volemia)
Duración	4 horas 30 min.
ACD	10:1
Volumen recolectado (mL)	200
Número de sesiones	3

---

TABLA 11. ANTICUERPOS MONOCLONALES EMPLEADOS

	CD	AcMo	Procedencia
<u>Serie linfoide</u>			
T	CD2	Leu5b	A
		P11	B
	CD3	Leu4	A
	CD4	Leu3	A
	CD8	Leu2a	A
B	CD19	Leu12	A
	CD20	Leu16	A
		BC1	C
<u>Serie mieloide</u>			
	CD15	My1	D
<u>Serie monocítica</u>			
	CD14	LeuM3	A
		Chris-6	C
<u>Células progenitoras</u>			
	CD34	My10	D
<u>No específicos de línea</u>			
	HLA-DR		A

CD: Grupo de diferenciación.

A: Becton-Dickinson.

B: Coulter Clone.

C: Knickerboker.

D: Menarini.

TABLA 12. REGIMENES QUIMIOTERAPICOS DE ACONDICIONAMIENTO

	Agente	Dosis/día	Dosis total
Régimen 1	Bu p.o.	4 mg/kg/d x4	16 mg/kg
	Cy i.v.	50 mg/kg/d x4	200 mg/kg
Régimen 2	BCNU i.v.	800 mg/m <sup>2</sup> /d	800 mg/m <sup>2</sup>
	AMSA i.v.	150 mg/m <sup>2</sup> /d x3	450 mg/m <sup>2</sup>
	VP-16 i.v.	150 mg/m <sup>2</sup> /d x3	450 mg/m <sup>2</sup>
	ara-C i. v.	100 mg/m <sup>2</sup> /d x3	300 mg/m <sup>2</sup>
Régimen 3	Cy i.v.	1,5 g/m <sup>2</sup> x4	6 g/m <sup>2</sup>
	VP-16 i.v	250 mg/m <sup>2</sup> x4	1000 mg/m <sup>2</sup>
	BCNU i.v.	200 mg/m <sup>2</sup> x4	800 mg/m <sup>2</sup>

TABLA 12. TOXICIDADES ASOCIADAS AL ACONDICIONAMIENTO.

	Grado I	Grado II	Grado III.
Toxicidad cardíaca.	Mínimos cambios en ECG que no requieren intervención médica; o aumento del tamaño cardíaco en Rx de tórax sin síntomas clínico.	Moderados cambios en ECG que responden a tratamiento médico; o requieren monitorización continuada sin tratamiento; o ICC que responde a digital o diuréticos.	Cambios severos en ECG con ausencia o sólo respuesta parcial al tratamiento médico; o ICC con ausencia o sólo mínima respuesta al tratamiento; o descenso en el voltaje de más del 50%.
Toxicidad vesical.	Hematuria macroscópica a partir de las 48 horas de la última dosis de quimioterapia, sin síntomas objetivos de cistitis y no causada por una infección.	Hematuria macroscópica a partir de una semana desde la última dosis de quimioterapia, no causada por infección; o hematuria a partir de las 48 horas con síntomas subjetivos de cistitis no causada por infección.	Cistitis hemorrágica franca, que requiere intervención local con uso de agentes esclerosantes, nefrostomía u otro tratamiento quirúrgico.
Toxicidad renal.	Aumento de la creatinina hasta dos veces su valor basal.	Aumento de la creatinina por encima de dos veces su valor basal, sin requerir diálisis.	Requerimientos de diálisis.
Toxicidad pulmonar.	Disnea sin cambios en la Rx de tórax y no causada por infección o ICC; o Rx de tórax con un infiltrado aislado o mínimos cambios intersticiales en paciente asintomático cuya causa no es infección o fallo cardíaco congestivo.	RX de tórax con infiltrado extenso o moderados cambios intersticiales combinados con disnea y no causados por infección o ICC; o descenso de la PO <sub>2</sub> (>10% de los valores basales) sin requerir ventilación mecánica ni oxigenoterapia >50% de O <sub>2</sub> no causada por infección o ICC.	Cambios intersticiales que requieren ventilación mecánica u oxigenoterapia >50% O <sub>2</sub> y no causados por infección o ICC.
Toxicidad hepática.	Mínima disfunción hepática con 2 mg% <bilirrubina <6 mg%; o aumento de peso >2.5% y <5% sobre el valor basal de origen no cardiogénico; o aumento de GOT más de 2 veces y menos de 5 del valor más bajo previo al acondicionamiento.	Disfunción hepática moderada con 6 mg% <bilirrubina <20 mg%; o aumento de GOT >5 veces por encima del valor previo al acondicionamiento; o ascitis clínica o documentada por imágenes >100 mL; o aumento de peso >5% sobre el valor basal de origen no cardíaco.	Disfunción hepática severa con bilirrubina >20 mg%; o encefalopatía hepática; o ascitis que compromete la función respiratoria.
Toxicidad en SNC.	Somnolencia pero el paciente es despertado con facilidad y se mantiene orientado.	Somnolencia con mantenimiento de confusión tras ser despertado; o presencia de nuevos síntomas objetivos sin pérdida de conciencia que no pueden explicarse por otras medicaciones, sangrado o infección del SNC.	Convulsiones o coma no documentadas por otra medicación, sangrado o infección del SNC.
Estomatitis	Dolor o ulceración que no requieren analgesia con morfina (u otros narcóticos) en perfusión IV continua.	Dolor o ulceración que requieren analgesia con morfina en perfusión IV continua.	Ulceración severa y/o mucositis que requiere intubación o que produce neumonía por aspiración con o sin intubación.
Toxicidad Gastro-intestinal	Deposiciones acuosas >500 mL y <2000 mL diarias y no relacionadas con infección.	Deposiciones acuosas >2000 mL diarias no relacionadas con infección; o deposiciones macroscópicamente hemorrágicas sin repercusión cardiovascular no causadas por infección; o suboclusión no relacionada con infección.	Ileo que requiere succión nasogástrica y/o cirugía y no está relacionado con infección; o enterocolitis hemorrágica con repercusión cardiovascular que requiere transfusión.

La toxicidad Grado IV se define como aquella toxicidad que produce la muerte del paciente. ICC: insuficiencia cardíaca congestiva.

## **RESULTADOS**



Los pacientes incluidos en el programa de recolección y autotransplante empleando células progenitoras de sangre periférica, van a ser analizados en dos niveles: por un lado, aquellos a los que se les ha efectuado al menos un ciclo de recolección de CPSP y, por otro lado, el grupo de pacientes sometidos a un ATSP, con especial referencia a la LMA en primera remisión completa.

## RECOLECCION DE CELULAS PROGENITORAS DE SANGRE PERIFERICA

### 1. Características de los pacientes.

El programa de recolección y autotransplante de CPSP se puso en marcha en Noviembre de 1989, habiéndose incluido hasta la fecha de cierre de este trabajo el 30 de Abril de 1991 un total de 34 pacientes cuyas principales características se muestran en las Tablas 14-16.

**Edad y Sexo:** La edad de los pacientes en la serie global estuvo comprendida entre 12 y 65 años, con una mediana de 40 años y un predominio de varones (22) frente a mujeres (12). Entre el grupo de pacientes con LMA en primera RC, la mediana de edad fue de 39 años (extremos 12 y 65) con una relación entre hombres y mujeres de 14/10. En los enfermos restantes, ocho hombres y tres mujeres, la mediana de edad fue de 24 años (extremos 12-56).

**Diagnóstico:** El diagnóstico más frecuente fue el de LMA con un total de 25 pacientes. De estos, 24 se encontraban en primera RC y sólo un paciente en segunda RC. Los subtipos morfológicos más frecuentes lo formaban las M1 (8 casos) y las M3 (4 casos, tres en primera RC). El número de pacientes en cada uno de los restantes subtipos se muestra en la Tabla 14.

Cinco pacientes se encontraban diagnosticados de LLA, dos en segunda RC y tres en tercera RC. Por subtipos inmunológicos, dos eran LLA-común, dos casos LLA-T y en un paciente la leucemia era de estirpe B. De dos pacientes con linfoma, uno de ellos estaba diagnosticado de linfoma no Hodgkin de grado intermedio (estadio IV) que se mostró resistente a la quimioterapia tipo COPA-MAB, encontrándose con infiltración medular al entrar en protocolo de recolección de CPSP. El único paciente con enfermedad de Hodgkin (variedad esclerosis nodular, estadio II-B) había sido resistente al tratamiento con ciclos alternantes de MOPP-ABVD y radioterapia. Dos de los tres pacientes con mieloma múltiple fueron remitidos desde otros centros, habiendo recibido previamente diversos regímenes quimioterápicos estando en segunda remisión en el momento de su inclusión en el programa de recolección de CPSP. El tercer paciente fue incluido en el programa de recolección y ATSP desde el diagnóstico.

## 2. Quimioterapia preféresis.

En todos los casos se procedió a la recolección de CPSP previa movilización mediante tratamiento quimioterápico. Los diferentes regímenes terapéuticos administrados, el número de ciclos y los pacientes a los que se les administró, se muestran en las Tablas 17-20.

El esquema más empleado (29 ciclos, 16 enfermos) fue el protocolo estándar de LMA que incluía una antraciclina y citarabina en secuencia 3x7. El protocolo de LMA para mayores de 60 años se administró en dos pacientes, mientras que el paciente con LMA en segunda RC recibió un esquema tipo ATA. Un ciclo adicional de quimioterapia con COAP fue administrado en seis pacientes con LMA (ocho ciclos) para proceder a la movilización y recolección de precursores. En cuatro casos por no poder realizarse la recolección tras la inducción, mientras que en los dos pacientes restantes no se pudo efectuar la recolección programada tras la inducción y consolidación.

En LLA el régimen terapéutico más empleado fue el R5-LAL-84 (tres enfermos). Se empleó, asimismo, el esquema COAP en dos pacientes multitratados y en los que no se creyó conveniente la administración de tratamientos quimioterápicos más agresivos. En los casos restantes los esquemas quimioterápicos administrados vinieron determinados por el diagnóstico y la situación clínica (Tabla 18).

### 3. Características de la sangre periférica al inicio de la recolección.

El inicio de las sesiones de recolección se efectuó de forma sistemática coincidiendo con el período de recuperación hemopoyética acelerada tras quimioterapia. En la Tabla 21 se muestran los principales hallazgos hematológicos encontrados en sangre al inicio de la primera recolección.

**Leucocitos:** Los recuentos leucocitarios oscilaron entre  $0,8 \times 10^9/L$  y  $4,9 \times 10^9/L$ , con una media de  $1,5 \pm 0,85 \times 10^9/L$ . Las cifras de leucocitos más elevadas corresponden a un paciente diagnosticado de mieloma en otro hospital y que fue remitido con dichos valores al ingresar en nuestro centro para la recolección.

**CMN:** El valor medio de CMN en sangre en la primera sesión fue de  $1,1 \pm 0,4 \times 10^9/L$  con unos valores extremos que oscilaron entre 0,3 y  $3 \times 10^9/L$ . Solo en tres pacientes se iniciaron las recolecciones con una cifra de CMN inferior al 30% (24-29%).

**Mielemia:** Se observó la presencia de mielemia en sangre en seis pacientes.

**Hemoglobina:** La tasa de hemoglobina osciló entre 8,3 y 13,9 g/dL, con una media de  $11,1 \pm 1,3$ . Solo en siete ocasiones se iniciaron las recolecciones con cifras de hemoglobina por debajo de 10 g/dL, procediéndose a la transfusión de dos CH antes del inicio de la recolección en estos casos.

**Plaquetas:** La cifra media de plaquetas fue de  $108 \pm 85 \times 10^9 / L$  con un rango que osciló entre 15 y 349. En 31 ocasiones se iniciaron las recolecciones con trombopenia inferior a  $100 \times 10^9$  plaquetas/L. En 16 casos esta cifra fue inferior a  $50 \times 10^9 / L$ . Solo tres enfermos requirieron transfusión de plaquetas previo al inicio de la recolección por presentar una cifra de plaquetas menor de  $20 \times 10^9 / L$ .

#### 4. Características de la recolección.

En total se han efectuado 186 sesiones de citoféresis durante el período de estudio, de las cuales 158 (85%) se efectuaron con el separador de flujo continuo CS-3000, y 25 (13%) con la centrífuga Cobe. Solo tres fueron realizadas con el separador de flujo discontinuo Haemonetics V-50, debido a avería del separador utilizado habitualmente. Las citoféresis se iniciaron entre los días 9 y 27 postquimioterapia (media  $17 \pm 3$  días), con una media de seis sesiones por paciente (extremos 3-10). Solo en un caso se realizaron más de siete féresis, debido al bajo rendimiento de CMN por un comienzo precoz de la recolección. La duración media por sesión fue de  $4 \pm 0,5$  horas (extremos 2,5-9 h).

De las 186 sesiones de recolección, 135 se han efectuado en pacientes con LMA en primera RC (56 postinducción, 45 postconsolidación y 24 post-COAP), 22 en pacientes con LLA y las 29 restantes entre el resto de pacientes. Las recolecciones se han efectuado en dos ciclos

de tres o cuatro sesiones diarias. Solo en dos pacientes se procedió a efectuar las recolecciones previstas en un solo ciclo.

#### 5. Resultados en bolsa de recolección.

Los valores medios obtenidos en bolsa de recolección según el separador empleado se muestran en la Tabla 22.

**Leucocitos:** La cifra media de leucocitos recolectados osciló entre  $31,3 \pm 18,2 \times 10^9 / L$  para la CS-3000 y  $22,4 \pm 15,7 \times 10^9 / L$  cuando se empleó la Cobe Spectra.

**CMN:** La cifra media de linfocitos y monocitos recolectada por el separador Fenwal fue de  $27,6 \pm 23,7 \times 10^9 / L$  frente a los  $17,2 \pm 15,4 \times 10^9 / L$  recolectados por la Cobe.

**Hemoglobina:** La hemoglobina en las CPSP recolectadas por el separador Fenwal fue de  $1,7 \pm 1,4$  g/dL y de  $1,7 \pm 2,4$  g/dL con el separador Cobe.

**Plaquetas:** La cifra media de plaquetas recolectada fue de  $348 \pm 308 \times 10^9 / L$  por el separador Cobe y de  $1019 \pm 843 \times 10^9 / L$  con la CS-3000. Al finalizar cada citoféresis y durante las primeras 70 recolecciones, se efectuó en la propia separadora (CS-3000 en todos los casos), una centrifugación a 900 rpm durante 10 minutos del contenido final de la cámara de recolección de granulocitos para recuperación de plaquetas y su reinfusión al paciente.

## 6. Rendimiento de precursores.

Los rendimientos de CMN y CFU-GM así como los índices de recuperación obtenidos se reflejan en la Tabla 22.

**CMN:** El valor medio de CMN recolectadas con el separador Cobe fue de  $1,2 \pm 0,8 \times 10^6$  /kg (extremos 0,4-3,7) y de  $0,98 \pm 0,7 \times 10^6$  /kg (rango 0,01-5,6) cuando se empleó la CS-3000.

**CFU-GM:** Los valores medios de precursores de la línea granulomonocítica obtenidos oscilaron entre  $4,99 \pm 9,6 \times 10^4$  /kg (extremos 0-39) y  $2,8 \pm 6,2 \times 10^4$  /kg (extremos 0-61) según que el separador empleado fuese Cobe o CS-3000 respectivamente. En 12 sesiones no se obtuvieron precursores granulomonocíticos.

**Índice de recuperación:** Sus valores medios oscilaron entre  $61 \pm 14\%$  (Cobe Spectra) y  $55 \pm 17\%$  (Fenwal CS-3000).

**Viabilidad precongelación:** El estudio de viabilidad celular efectuado tras finalizar la recolección y antes de proceder a la congelación osciló entre el 65-99% con un valor medio del 98%.

## 7. Marcadores inmunológicos.

El estudio de marcadores inmunológicos efectuado en las células recolectadas se muestra en la Tabla 23. No se observó la existencia de correlación entre las células CD34 positivas y los precursores granulomonocíticos. El valor

medio de células CD34+ fue de  $3,2 \pm 5,2 \times 10^6$  /kg de peso con unos extremos que oscilaron entre  $0-35 \times 10^6$  /kg.

#### 8. Toxicidad y complicaciones durante la recolección.

**Toxicidad:** La tolerancia durante la recolección fue excelente, no observándose ninguna reacción adversa del tipo de vómitos, síncope, hipotensión o hematomas por venopunción. Los efectos secundarios más frecuentemente detectados fueron los relacionados con la administración del anticoagulante dextrosa-citrato a una velocidad excesivamente rápida, ocasionando síntomas de hipocalcemia leve (hormigueo alrededor de la boca y en manos). Estas manifestaciones aparecieron sólo en seis pacientes, y desaparecieron al disminuir la velocidad de infusión del anticoagulante sin que fuese necesaria la administración de gluconato cálcico. Solamente en una ocasión se hizo necesario suspender el proceso de recolección por la aparición de un cuadro vegetativo grave tras una hematemesis en un paciente con ulcus duodenal.

**Complicaciones:** Otras complicaciones observadas fueron la aparición en cuatro casos de flujos lentos en el circuito de entrada que ocasionaron enlentecimientos y retrasos en el proceso de recolección así como dificultades para la formación de la interfase plasma/CMN/hematíes.



## 9. Repercusión de las recolecciones sobre el recuento sanguíneo.

La cifra de leucocitos sufrió un ligero descenso en el hemograma postféresis ( $2,4 \pm 1,7 \times 10^9 / L$  versus  $2,2 \pm 1,7 \times 10^9 / L$ ) aunque sin diferencias significativas. Este descenso fue debido especialmente a expensas de la cifra de linfocitos que sufrió un descenso entre ambos hemogramas con significación estadística ( $P = 0,01$ ). También los monocitos sufrieron una variación entre ambas determinaciones, si bien de escasa cuantía, con un valor medio preféresis de  $0,5 \pm 0,6 \times 10^9 / L$  frente a los  $0,4 \pm 0,4 \times 10^9 / L$  postrecolección. Se observaron diferencias más acusadas entre los valores de hemoglobina y plaquetas pre y postrecolección. Así, los valores medios preféresis de plaquetas fueron de  $107 \pm 78 \times 10^9 / L$  frente a  $73 \pm 56,5 \times 10^9 / L$  postféresis, siendo estas diferencias significativas ( $P < 0,0001$ ). Del mismo modo, la cifra de hemoglobina disminuyó de manera casi sistemática tras finalizar la recolección con unas cifras que oscilaron entre los  $11,3 \pm 1,6$  g/dL preféresis y los  $10,5 \pm 2,4$  g/dL postféresis ( $P < 0,0001$ ).

En nueve casos se procedió a la transfusión de concentrados de plaquetas postféresis por presentar recuentos inferiores a  $20 \times 10^9 / L$ , mientras que sólo fue necesaria la transfusión de CH en dos ocasiones. Las modificaciones observadas entre los recuentos pre y

---

postcitoféresis están reflejadas en la Tabla 24.

TABLA 14. RECOLECCION DE CPSP. CARACTERISTICAS GENERALES (I)

Característica	LMA primera RC	Otros	Serie global
Pacientes	23	11	34
Sexo			
Varones	13	9	22
Edad (años)			
Mediana	39	24	40
Extremos	14-65	12-56	12-65
Diagnóstico			
LMA			
M0	1		1
M1	8		8
M2	2		2
M3	3	1	4
M4	3		3
M5	2		2
M6	3		3
M7	1		1
LLA		5	
Común		2	2
T		2	2
B		1	1
LNH		1	1
EH		1	1
Mielomas		3	3
Días posquimioterapia			
Mediana	17	15	17
Extremos	9-27	9-19	9-27
N de féresis/paciente			
Mediana	6	6	6
Extremos	3-10	3-6	3-10
CMN ( $\times 10^6$ /kg)/féresis			
Mediana	0,8	0,76	0,78
Extremos	0,1-5,6	0-3,7	0-5,6
CFU-GM ( $\times 10^4$ /kg)/féresis			
Mediana	0,9	0,7	0,8
Extremos	0-61	0-31	0-61

---

**TABLA 15. PACIENTES INCLUIDOS EN PROGRAMA DE RECOLECCION DE CPSP. CARACTERISTICAS GENERALES (II)**


---

Caso	Sexo	Edad	Diagnóstico	Situación hematológica
FFG	V	14	LMA-M2	Primera RC
JTF	V	26	LMA-M1	Primera RC
APLL	H	28	LMA-M1	Primera RC
QVL	H	17	LMA-M1	Primera RC
OGS	V	19	LMA-M6	Primera RC
JRM	V	29	LMA-M4	Primera RC
ADC	V	34	LMA-M5	Primera RC
JRB	H	54	LMA-M2	Primera RC
REC	H	37	LMA-M3	Primera RC
JDH	V	57	LMA-M1	Primera RC
RMP	V	62	LMA-M1	Primera RC
CAH	H	28	LMA-M4	Primera RC
VMB	V	55	LMA-M7	Primera RC
FDB	H	57	LMA-M1	Primera RC
ELL	V	58	LMA-M4	Primera RC
APG	H	57	LMA-M3	Primera RC
SDC	H	33	LMA-M3	Primera RC
JZS	V	46	LMA-M7	Primera RC
ACA	H	65	LMA-M1	Primera RC
LDB	H	22	LMA-M0	Primera RC
JGM	V	46	LMA-M5	Primera RC
RAF	V	42	LMA-M6	Primera RC
MFR	V	43	LMA-M1	Primera RC

---

**TABLA 16. PACIENTES INCLUIDOS EN PROGRAMA DE RECOLECCION DE CPSP. CARACTERISTICAS GENERALES (III)**

Caso	Sexo	Edad	Diagnóstico	Situación hematológica
JOM	V	18	LMA-M3	Segunda RC
IBM	V	14	LLA-T	Tercera RC
JLG	V	18	LLA-Común	Segunda RC
LCA	H	47	LLA-B	Tercera RC
VBB	V	18	LLA-T	Tercera RC
JRE	H	12	LLA-Común	Tercera RC
CCL	H	24	EH	Refractario
FEM	V	36	LNH	Refractario
APQ	V	55	Mieloma	Segunda remisión
RCC	V	49	Mieloma	Segunda remisión
JMG	V	56	Mieloma	Previamente no tratado

TABLA 17 . RECOLECCION DE CPSP. QUIMIOTERAPIA PREFERESIS (I)  
LMA EN PRIMERA REMISION

Esquema	Diagnóstico	N de ciclos
6-LAM-87	LMA (no M3)	28
2-LAP-83	LMA-M3	5
7-LAM-88	LMA >60 años	2
COAP	LMA	7

COAP: Ciclofosfamida, Vincristina, Citarabina, Prednisona.

TABLA 18. RECOLECCION DE CPSP. QUIMIOTERAPIA PREFERESIS (II)

Esquema	Diagnóstico	N de ciclos
ATA	LMA-M3 segunda RC	2
R5-LAL-84	LLA en recaida	5
COAP	LLA en recaida	3
DATOP	LLA en recaida	1
MIME	Linfomas en recaida	3
Melfalan (A.D.)	Mieloma	1
VAD-BCNU	Mieloma	1
VM-Dexametasona	Mieloma	1

ATA: ara-C, AMSA, 6-TG; COAP: Ciclofosfamida, Vincristina, araC, Prednisona; DATOP: Daunorrubicina, ara-C, 6-Tioguanina, Vincristina, Prednisolona; MIME: metil-GAG, Ifosfamida, Metotrexate, Etoposido; VAD-BCNU: Vincristina, Adriamicina, Daunorrubicina, Carmustine.

TABLA 19. RECOLECCION DE CPSP. RENDIMIENTOS OBTENIDOS (Ia)

Caso	Quimioterapia preféresis	Número de féresis	CFU-GM (x10 <sup>4</sup> /Kg)	CMN (x10 <sup>6</sup> /Kg)	Evolución
FFG	6-LAM-87	7	10,2	7,9	ATSP
JTF	6-LAM-87	6	2,2	5	ATSP
APLL	6-LAM-87	7	11	10,3	ATSP
	COAP	3			
QVL	6-LAM-87	6	31,3	15	ATSP
OGS	6-LAM-87	6	29,9	9,7	ATSP
JRM	6-LAM-87	3	1,5	4,8	ATSP
	COAP	3			
ADC	6-LAM-87	6	8	4,5	ATSP
JRB	6-LAM-87	6	5,4	3,6	ATSP
REC	2-LAP-83	6	4,7	5,3	ATSP
JDH	6-LAM-87	3	8,3	7,3	ATSP
	COAP	3			
RMP	7-LAM-88	3	17,3	4,8	ATSP
	COAP	3			
CAH	6-LAM-87	6	2,6	4,4	ATSP

COAP: Ciclofosfamida, Vincristina, Citarabina, Prednisona.

TABLA 19. RECOLECCION DE CPSP. RENDIMIENTOS OBTENIDOS (Ib)

Caso	Quimioterapia preféresis	Número de féresis	CFU-GM (x10 <sup>4</sup> /Kg)	CMN (x10 <sup>5</sup> /Kg)	Evolución
VMB	6-LAM-87	6	36,5	5,6	ATSP
FDB	6-LAM-87	6	21,8	4,3	ATSP
ELL	6-LAM-87	6	70,1	7,2	ATSP
APG	2-LAP-83	6	18,8	3,9	ATSP
SDC	2-LAP-83	3	5,6	1,1	Muerto
JZS	6-LAM-87	3	11,4	1,7	*
ACA	7-LAM-88	4	43,4	2,1	#
LDB	6-LAM-87	6	36	6,5	§
JGM	COAP	3	15,9	4,8	§
RAF	6-LAM-87	3	4,7	2,7	Muerto
MFR	COAP	6	63,2	3,6	§

COAP: Ciclofosfamida, Vincristina, Citarabina, Prednisona.

\* Pendiente segundo ciclo de recolección.

# Fuera de protocolo por edad avanzada.

§ Pendiente de ATSP.



TABLA 20. RECOLECCION DE CPSP. RENDIMIENTOS OBTENIDOS (II)

Caso	Quimioterapia preféresis	Número de féresis	CFU-GM (x10 <sup>4</sup> /Kg)	CMN (x10 <sup>8</sup> /Kg)	Evolución
JOM	ATA	6	37,1	6,5	ATSP
IBM	R5-LAL-84	3	6,8	4,5	ATSP
	COAP	3			
JLG	R5-LAL-84	6	4,3	4,7	ATSP
LCA	COAP	6	3	6,5	ATSP
VBB	R5-LAL-84	6	4,1	3,9	ATSP
JEC	DATOP	4	5,6	2,9	Muerto
CCL	MIME	6	6,2	4	ATSP
FEM	MIME	4	7,5	1,8	Muerto
APQ	VM26-DEXAMETASONA	4	0,5	1,1	Muerto
RCC	VAD-BCNU	3	7,4	7,8	Muerto
JMG	MELFALAN (AD)	6	44,8	12,7	Muerto

ATA: ara-C, 6-Tioguanina, M-AMSA; COAP: Ciclofosfamida, Vincristina, araC, Prednisona; DATOP: Daunorrubicina, ara-C, 6-Tioguanina, Vincristina, Prednisolona; MIME: metil-GAG, Ifosfamida, Metotrexate, Etoposido, VAD-BCNU: Vincristina, Adriamicina, Daunorrubicina, Carmustine. AD: Altas dosis.

TABLA 21. INICIO DE RECOLECCION: CIFRAS DE SANGRE PERIFERICA

Característica	Media±DE	Extremos
Leucocitos ( $\times 10^9$ /L)	1,5±0,8	0,8-4,9
CMN $\times 10^9$ /L	1,1±0,4	0,3-3
PMN $\times 10^9$ /L	0,4±0,6	0-2,5
Hemoglobina (g/dL)	11,1±1,3	8,3-13,9
Plaquetas ( $\times 10^9$ /L)	108±85	15-349

TABLA 22. VALORES BOLSA DE RECOLECCION SEGUN SEPARADOR

	CS-3000		Cobe Spectra	
	Media±DE	Extremos	Media±DE	Extremos
Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L)	31±18	3,5-114	22,4±15,7	6,7-62
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	1013±842	67-4972	348±307	72-1129
PMN (x10 <sup>9</sup> /L)	4,6±7,3	0-54	5,5±5,3	0-17,5
Linfocitos (x10 <sup>9</sup> /L )	14,8±10,4	0-81	5,3±3,4	1,1-11,4
Monocitos (x10 <sup>9</sup> /L)	8,7±9,1	0-47	11±11,8	0,7-41
Hemoglobina (g/dL)	1,7±1,4	0,2-10	1,7±2,2	0,3-11,2
CFU-GM (x10 <sup>4</sup> /kg)	1,8±4,8	0-61	4,9±9,6	0-39
CMN (x10 <sup>8</sup> /kg)	0,9±0,7	0-5,6	1,2±0,8	0,4-3,7
I. de recuperación (%)	55±17	45-99	61±14	40-99
Volumen (mL)	185±21	75-299	399±30	354-490

TABLA 23. ESTUDIO INMUNOLOGICO DE LAS CELULAS RECOLECTADAS

	Grupo de diferenciación	Sesiones	% células positivas	
	CD	N	Media±DE	Extremos
<u>Serie linfoide</u>				
T	CD2	76	39,6±21	3-80
	CD3	108	33,3±18	3-75
	CD4	137	18,5±12	1-55
	CD8	136	17,1±13	1-84
B	CD19	18	4,9±3	0-10
	CD20	117	3,2±9	0-98
<u>Serie mieloide</u>				
	CD15	127	2,5±4	0-33
<u>Serie monocítica</u>				
	CD14	134	45±20	3-94
<u>Células progenitoras</u>				
	CD34	107	3,9±7	0-53
<u>No específicos de línea</u>				
	HLA-DR		54,3±22	5-92

**TABLA 24. VARIACIONES EN LOS RECUENTOS DE SANGRE PERIFERICA TRAS LA RECOLECCION**

Característica	Preféresis		Postféresis		P
	Media±DE	Extremos	Media±DE	Extremos	
Leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L)	2,4±1	0,6-14,3	2,2±1,7	0,6-4,9	NS
PMN (x10 <sup>9</sup> /L)	0,9±1,2	0-9,7	0,9±1,2	0-10	NS
Linfocitos (x10 <sup>9</sup> /L)	0,8±0,5	0,2-3	0,7±0,4	0-5,9	0,01
Monocitos (x10 <sup>9</sup> /L)	0,5±0,6	0-6	0,4±0,4	0-2,9	NS
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	105±79	11-349	73±56	8-258	0,0001
Hemoglobina (g/dL)	11,3±1,6	8-24	10,1±1,8	7,5-14	0,0001

NS: No significativa.

**AUTOTRANSPLANTE DE CELULAS PROGENITORAS DE SANGRE PERIFERICA**

Desde noviembre de 1989 hasta mayo de 1991 se han efectuado 22 autotransplantes empleando células progenitoras de sangre periférica de un total de 34 pacientes incluidos en el programa.'

El grupo de enfermos en el que se ha efectuado el mayor número de transplantes ha sido el de LMA. En la figura 6 se muestra en un diagrama la opción terapéutica asignada a estos pacientes en el periodo de tiempo en que el programa de ATSP ha estado activo. De un total de 79 enfermos diagnosticados de LMA, 61 recibieron tratamiento de inducción a la remisión, no habiendo sido tratado los 18 restantes por edad avanzada (15 casos) o por otros motivos de exclusión (3 casos). Entre los pacientes que recibieron tratamiento, 41 tenían menos de 60 años alcanzándose la RC en 28 casos, cinco de los cuales disponían de donante HLA-compatibles por lo que se realizó transplante alogénico de médula ósea, incluyéndose los 23 pacientes restantes (22 en primera RC y uno en segunda RC) en programa de ATSP. Por otro lado, entre el grupo de pacientes de edad superior a 60 años tan solo en dos se realizaron recolecciones de CPSP.

ATSP en LMA en primera RC. Hasta la fecha de cierre del estudio, 15 de 23 pacientes con LMA en primera RC que han entrado en programa de ATSP han sido sometidos a autotransplante. De los ocho pacientes restantes, tres han

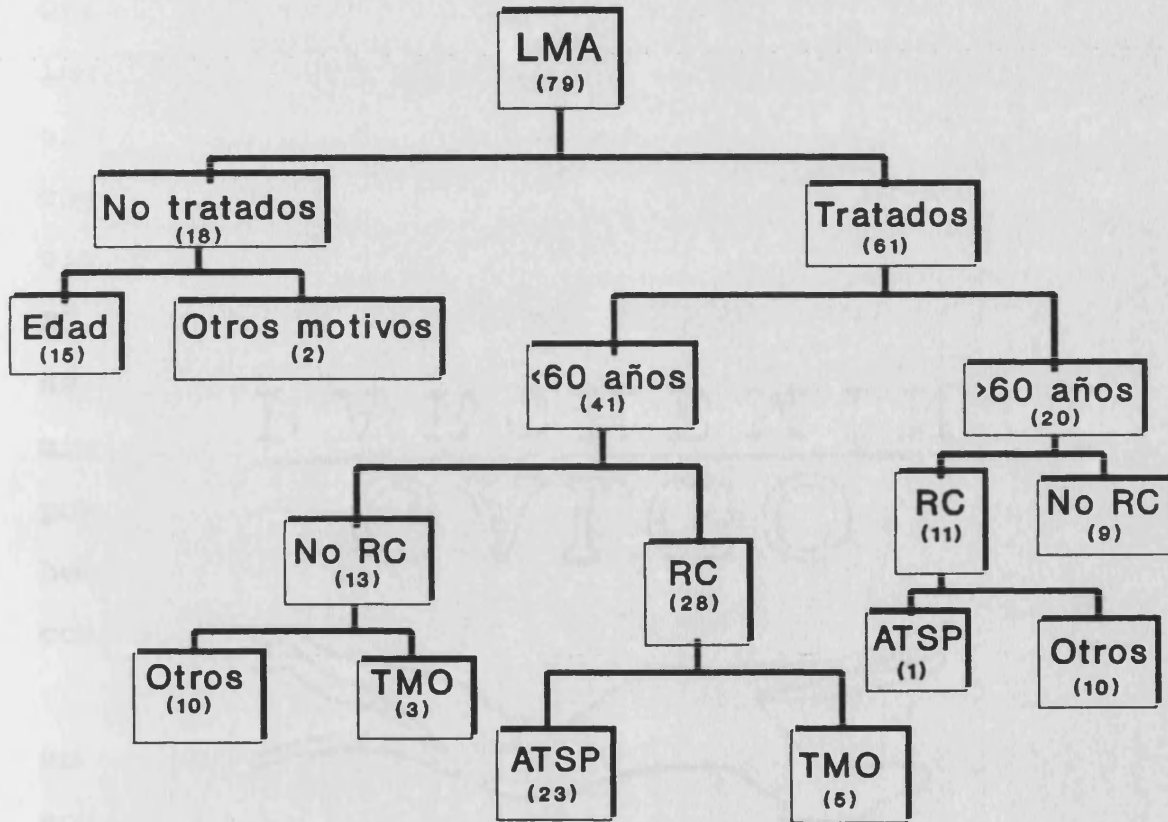


Figura 6. Evolución de los pacientes con LMA.

finalizado las recolecciones y están pendientes de ATSP, cuatro han fallecido y uno se encuentra pendiente del segundo ciclo de recogida de progenitores. La figura 7 muestra la evolución de los pacientes con LMA en primera RC incluidos en programa de ATSP.

ATSP en pacientes con otras situaciones hematológicas.

Otros 12 pacientes con diferentes diagnósticos han sido incluidos en programa de ATSP (figura 7), habiéndose efectuado el autotransplante en siete. Por diagnósticos, cuatro eran LLA (dos en segunda RC, uno en tercera RC y el último en segunda recidiva medular), dos LMA (uno en segunda RC y otro en primera recidiva) y un paciente con enfermedad de Hodgkin resistente. Los cinco enfermos restantes, tres mielomas, un LNH y una LLA han fallecido antes del ATSP (dos por enfermedad progresiva, uno por neumonía, un caso de hemoptisis masiva y un caso de insuficiencia cardíaca congestiva).

En este capítulo se han considerado para el estudio por un lado los pacientes con LMA en primera RC (grupo A, 15 enfermos), agrupándose el resto de los pacientes en un segundo bloque (grupo B, siete enfermos), refiriéndonos a los resultados del ATSP en cada grupo por separado.



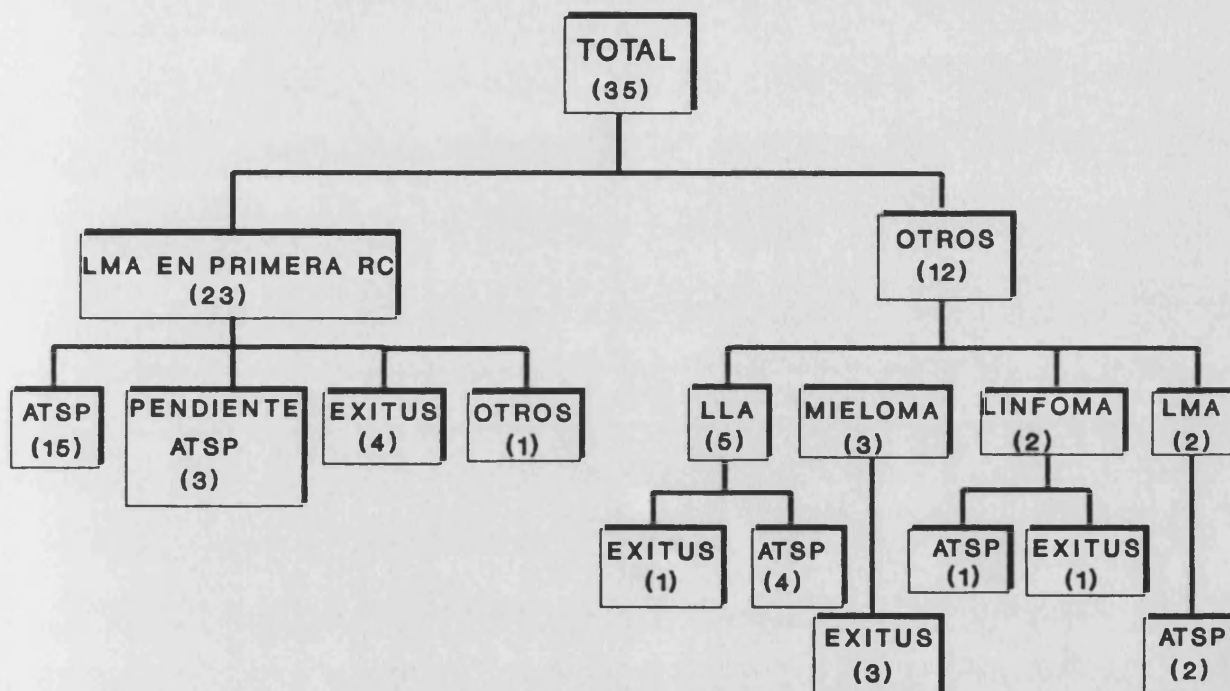


Figura 7. Curso evolutivo de los pacientes sometidos a recolección de CPSP.

## CARACTERISTICAS DE LOS PACIENTES

Las principales características de los pacientes se muestran en la Tabla 25.

### 1. Datos clínicos.

**Edad y sexo:** La mediana de edad de la serie fue de 33 años (rango 14-62) con una distribución por sexos de 14 varones y 8 mujeres. Entre los pacientes con LMA en primera RC la mediana de edad fue de 27 años, con unos extremos entre 14 y 62 años, y con un mayor número de hombres que de mujeres (10 versus 5), mientras que en los enfermos del grupo B cuatro eran hombres y tres mujeres con una mediana de edad de 18 años (rango 14-57).

### Diagnóstico y situación hematológica:

Grupo A: Como ya se ha citado, los 15 enfermos de este grupo se encontraban en primera RC. Todos los enfermos menos uno (con más de 60 años) alcanzaron RC tras un ciclo de inducción.

Grupo B: En dos de los pacientes de este grupo (una LMA y una LLA) se documentó recaída medular una vez finalizada la recolección e inmediatamente antes del transplante, efectuándose éste en recidiva. Cuatro enfermos se encontraban en segunda (dos casos) y tercera RC (dos casos). Por fin, el paciente con EH se encontraba en remisión de su

enfermedad.

**Progenitores administrados:** Para el grupo de pacientes con LMA en primera RC la media de CFU-GM y CMN administradas fue de  $17,2 \pm 18,5 \times 10^4$  /kg (extremos 1,5-70,1) y  $6,7 \pm 3,1 \times 10^8$  /kg (extremos 3,6-15) respectivamente. Para el resto de la serie estos valores fueron de  $11,4 \pm 12,4$  CFU-GM  $\times 10^4$  /kg (extremos 3-37,1) y  $4,8 \pm 1,1$  CMN  $\times 10^8$  /kg (extremos 3,9-6,5).

**Sesiones de recolección:** En todos los pacientes se habían finalizado los dos ciclos de recolección previstos para la obtención de CPSP, con un número de féresis entre 6 y 10 (mediana 6).

**Intervalo RC-ATSP:** Para los pacientes del grupo A el tiempo transcurrido desde la fecha de RC hasta el ATSP fue de 121 días de media (extremos 62-172). Para el resto de la serie estos valores oscilaron entre 44 y 157 días, con un tiempo medio de 87 días.

## 2. Datos de bioquímica sérica pretransplante.

Las únicas alteraciones en los parámetros bioquímicos pretransplante fueron elevaciones en las transaminasas. Así, en los pacientes del grupo A siete presentabas cifras de GOT y GPT superiores a 50 U/L, mientras que estas alteraciones se observaron en cinco de los siete enfermos del grupo B.

### 3. Datos de hemostasia y coagulación.

En todos los pacientes se realizaron determinaciones del tiempo de tromboplastina parcial activado, fibrinógeno e índice de Quick, no observándose en ningún caso alteraciones relevantes.

### 4. Datos hematológicos de sangre periférica.

Entre los pacientes del grupo B se observó la presencia de trombopenia inferior a  $100 \times 10^9$  plaquetas/L en tres casos, no detectándose ésta en ningún caso del grupo A.

### 5. Datos de la médula ósea.

El estudio medular no mostró alteraciones en ninguno de los pacientes con LMA en primera RC. Por el contrario, se evidenció la presencia de un infiltrado blástico en dos casos del grupo B que suponían el 9% y 16% de la celularidad global de médula, respectivamente.

---

**ACONDICIONAMIENTO E INFUSION DE CELULAS PROGENITORAS****1. Regímenes de acondicionamiento. (Tabla 12)**

Grupo A: El régimen de acondicionamiento empleado en todos los pacientes con LMA en primera RC fue la combinación Cy-Bu según el esquema descrito en Material y Métodos. La administración se realizaba de forma simultánea durante los días -6, -5, -4 y -3. Tras dos días sin quimioterapia (-2, -1) se procedía la infusión de las CPSP (día 0).

Grupo B: Cuatro pacientes recibieron el mismo régimen que los del grupo A. De los tres pacientes restantes, dos fueron tratados con la combinación BCNU, AMSA, VP-16 y Ara-C (régimen 2) mientras que el paciente restante recibió Cy, VP-16 y BCNU (régimen 3). Ambos regímenes se administraron durante cuatro días consecutivos (-6, -5, -4 y -3) infundiéndose las CPSP a las 48 horas de finalizar el acondicionamiento.

**2. Infusión de células progenitoras.**

En la Tabla 26 se muestran de forma esquemática las características más importantes de la descongelación e infusión de CPSP. Para evitar el contacto prolongado de las células con el DMSO a una temperatura superior a 4° C el tiempo de descongelación y de administración procuró ser lo más breve posible. Por cada 75-150 mL administrados (una

bolsa), la descongelación se efectuó en un tiempo medio de 56 segundos (extremos 40-160), mientras que la infusión se realizó en un tiempo medio de 4 minutos (rango 3-6). El intervalo entre cada bolsa fue de 3-4 horas con un volumen total administrado que osciló entre 600 y 2.850 mL (media 1.000 mL). El volumen medio de hematíes administrado fue de 37,4 mL (rango 16,3-171,2) y el de DMSO osciló entre 60-285 mL (media de 100 mL). La infusión se realizó a lo largo de un día para 17 pacientes, mientras que en el resto de los enfermos se repartió en dos días.

### 3. Toxicidad durante la infusión.

Las complicaciones desarrolladas por los pacientes durante la infusión de las CPSP fueron leves en todos los casos. Las más frecuentes fueron la aparición de náuseas y vómitos (cuatro pacientes), así como enrojecimiento facial y taquicardia (tres casos). Otros síntomas ocasionalmente presentes durante la infusión fueron taquipnea, tos y disnea leve. En ningún caso se desarrollaron complicaciones relacionados con hipervolemia o con la administración de hemoglobina libre. En general, la sintomatología asociada a la infusión de las CPSP cedió poco después de finalizar ésta, no requiriendo en ninguna ocasión medidas terapéuticas específicas.

---

**ANALISIS DE LOS VALORES HEMOPOYETICOS****1. Recuperación de neutropenia.**

El tiempo medio transcurrido desde el inicio del acondicionamiento hasta la aparición de la neutropenia ( $<0,5 \times 10^9$  PMN/L) fue de 9 días (extremos 8-15) para el grupo A, mientras que en los pacientes del grupo B estos valores oscilaron entre 8 y 13 días con una mediana de 10 días. En todos los pacientes se evidenció neutropenia severa, siendo el valor medio del nadir de leucocitos de  $0,2 \times 10^9$  /L alcanzando todos los pacientes cifras inferiores a  $0,5 \times 10^9$  leucocitos/L. La duración media de la neutropenia (días desde PMN  $<0,5$  hasta  $>0,5 \times 10^9$  /L) fue de 13 días (rango 10-16) para los enfermos del grupo A y de 15 días (extremos 11-26) para el resto de los pacientes. Todos los enfermos del grupo A alcanzaron una cifra de PMN superior a  $1 \times 10^9$  PMN/L con un rango de 11 y 26 días (media 14). Asimismo, en los siete pacientes del grupo B se observó una total recuperación de los recuentos leucocitarios transcurrida una media de 20 días (extremos 13-32).

**2. Factores de crecimiento.**

Se procedió a la administración de inmunomoduladores (factor de crecimiento granulomonocítico, GM-CSF, Schering-Plough, USA) previo consentimiento informado del

enfermo, en tres casos. En dos de ellos (uno del grupo A y otro del grupo B) se documentó pancitopenia tras recuperación hemoperiférica inicial a los +40 y +48 días respectivamente con un descenso acusado en la cifra de granulocitos que alcanzaron valores inferiores a  $0,2 \times 10^9/L$ . Asimismo, se utilizó GM-CSF con carácter compasivo en el paciente con enfermedad de Hodgkin en el que no se había evidenciado recuperación hemopoyética alguna el día +21. En los tres pacientes la dosis inicial de GM-CSF fue de  $5 \mu\text{g/kg/día}$  durante 15 días, administrados en infusión i.v. continua en 4-6 horas. Al no observarse recuperación hemoperiférica se procedió a incrementar la dosis hasta un total de  $10 \mu\text{g/kg/día}$  durante cinco días más. En dos de los tres pacientes no pudo evaluarse la respuesta al fallecer durante la administración de GM-CSF. En el tercer paciente, que recibió la dosis total, no se evidenció recuperación hemoperiférica falleciendo en situación de aplasia medular.

### 3. Recuperación de los recuentos plaquetares.

En todos los pacientes tras el acondicionamiento se alcanzaron cifras de plaquetas por debajo de  $20 \times 10^9/L$ . La cinética de recuperación plaquetar fue mucho más irregular que la referida para la serie granulocítica. Así, 14 de los enfermos del grupo A alcanzaron cifras de plaquetas superiores a  $20 \times 10^9/L$  en un tiempo medio de 16 días (extremos 7-94). En el grupo B alcanzaron esta cifra cinco



de los siete enfermos, entre los 16 y 233 días, con un tiempo medio de 53 días. Mientras que solamente un paciente del grupo B ha recuperado unas cifras de plaquetas superiores a  $50 \times 10^9 / L$  (día +68), 13 de los enfermos del grupo A han alcanzado esta cifra entre los 12 y 213 días postransplante (media 30 días). El tiempo medio hasta la desaparición de la trombopenia (plaquetas  $>100 \times 10^9 / L$ ) ha sido de 77 días (rango 25-140) para los siete enfermos del grupo A que han alcanzado esta cifra, y de 93 días para el único paciente del resto de la serie que ha alcanzado este valor.

La Tabla 27 muestra las características de la recuperación hemopoyética en ambos grupos y en la serie global.

#### 4. Estudio de médula ósea postransplante.

En 21 de los 22 pacientes se realizó un primer estudio medular entre los días 12-14 post autotransplante cuyos resultados se resumen en la Tabla 28.

**Celularidad cuantitativa.** El estudio medular mostró la presencia de celularidad disminuida en 11 de los pacientes del grupo A, mientras que en los cuatro restantes se evidenció la presencia de una celularidad cuantitativamente normal. Entre los pacientes del grupo B, cuatro presentaron celularidad pobre en la primera muestra medular tras ATSP y solo en un caso se observó celularidad hemopoyética en

límites de normalidad.

**Celularidad cualitativa.** En el grupo de pacientes con LMA se observaron precursores de línea eritroide y mieloide en todos los casos, mientras que la serie megacariocítica estuvo presente en 13 casos. Grupo B: en estos pacientes seis presentaron precursores de serie roja y blanca, mientras que la presencia de megacariocitos solo pudo detectarse en dos enfermos. Los dos pacientes transplantados en recidiva mostraron persistencia del infiltrado blástico en el primer control medular postransplante.

#### 5. Infusión de médula ósea autóloga.

En dos pacientes del grupo A en los que no se evidenció recuperación hemoperiférica estable se procedió a la infusión de la médula ósea autóloga a los 63 y 75 días post ATSP. Uno de ellos restableció la función hemopoyética con normalización de parámetros en sangre mientras que el otro falleció a los 12 días por complicaciones sépticas y sin evidencia de prendimiento medular.

#### 6. Relación entre recuperación hemopoyética y precursores infundidos (Figuras 8 y 9).

Se evidenció la existencia de una relación entre la velocidad de recuperación granulopoyética y la dosis de CFU-GM infundida. Para los 12 enfermos que recibieron >7

CFU-GM  $\times 10^4$ /kg el tiempo medio transcurrido hasta la obtención de  $0,5$  y  $1 \times 10^9$  PMN/L fue de 13 (extremos 10-16) y 15 días (extremos 11-26) respectivamente, frente a los 16 (extremos 11-26) y 21 días (extremos 12-32) del resto de la serie, diferencias que mostraron significación estadística ( $P=0,01$  y  $0,03$  respectivamente).

## 7. Características del soporte transfusional. (Tabla 29)

7.1. Concentrados de hematíes (CH). Dos de los pacientes del grupo A no requirieron la administración de CH en ningún momento post ATSP por no alcanzar cifras de hemoglobina inferiores a 10 g/dL. En los restantes enfermos la media de CH transfundido fue de cuatro, con unos extremos que oscilaron entre dos y ocho. Entre los enfermos del grupo B las unidades de CH administradas variaron entre tres y ocho con un valor medio de cuatro CH.

7.2. Concentrados de plaquetas. Todos los enfermos requirieron la administración de concentrados de plaquetas por presentar cifras inferiores a  $20 \times 10^9$ /L en algún momento de la evolución. Para los pacientes con LMA en primera RC la cifra media de plaquetas transfundidas fue de 24 (extremos 6-326). En tre los patients del Grupo B la media de unidades de plaquetas transfundida fue de 86 (extremos 40-138). Dos de los enfermos de este grupo necesitaron la administración de plaquetas de donante único por la ausencia de rendimientos con plaquetas de donantes al azar.

Figura 8. Probabilidad de alcanzar  $0,5 \times 10^9$  PMN/L según dosis de CFU-GM administrada ( $\times 10^4$ /kg)

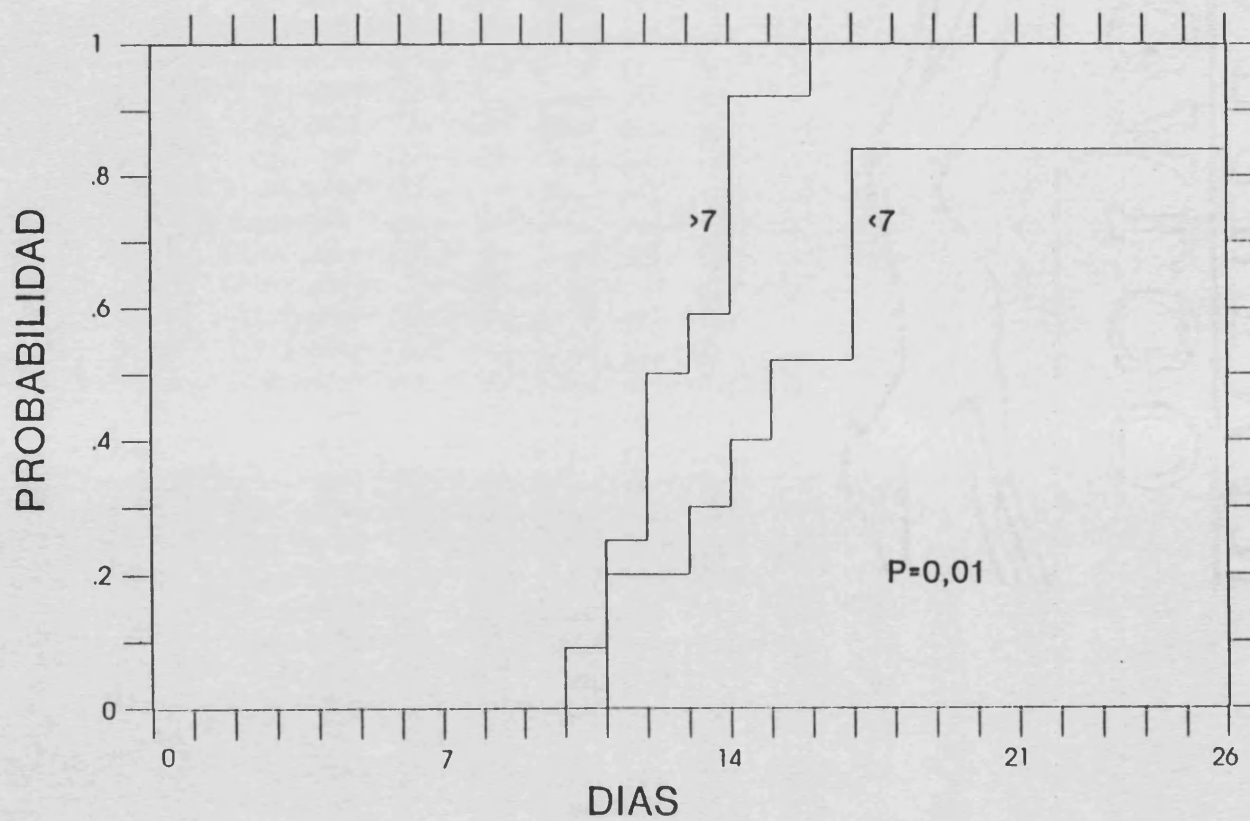
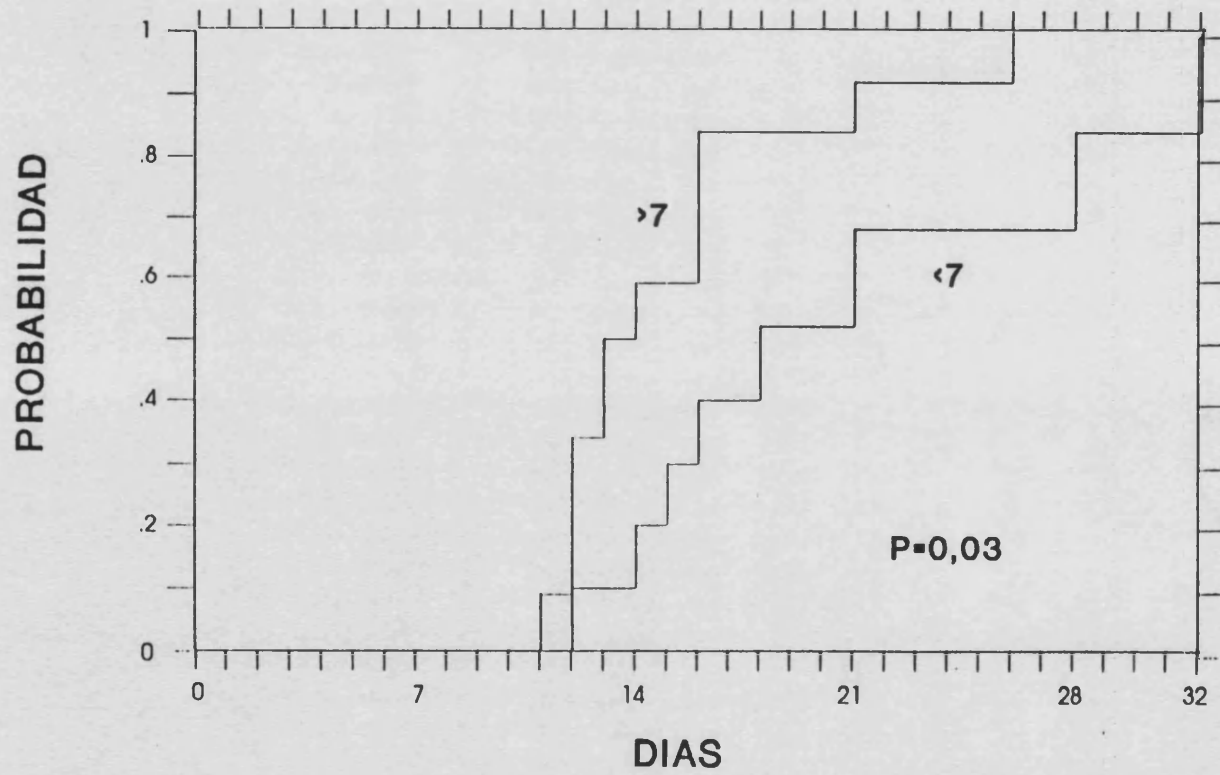


Figura 9. Probabilidad de alcanzar  $1 \times 10^9$  PMN/L según dosis de CFU-GM administrada ( $\times 10^4$ /kg).



## 8. Días de hospitalización.

El tiempo medio de hospitalización para los enfermos del grupo A osciló entre 19 y 90 días con una mediana de 27 días, mientras que para el resto de los pacientes la media de días hospitalizados fue de 34 días (extremos 22-51). En este grupo un paciente dado de alta a los 22 días con recuperación hemopoyética de serie blanca, volvió a requerir ingreso hospitalario por la aparición de pancitopenia severa a los 48 días postransplante, falleciendo durante este segundo ingreso sin signos de recuperación hemopoyética.

## TOXICIDAD DEL ACONDICIONAMIENTO Y COMPLICACIONES DEL TRANSPLANTE

### 1. Toxicidad del acondicionamiento.

Las toxicidades de los regímenes de acondicionamiento se muestra en la Tabla 30.

#### 1.1 Toxicidad global.

Todos los pacientes presentaron toxicidad derivada del regimen de acondicionamiento en al menos un sistema. La mayoría de la toxicidad fue leve o moderada (grado I-II), siendo la mucositis orofaríngea la más frecuente. Los grados de toxicidad más grave (III-IV) aparecieron ocasionalmente y afectaron corazón, riñón, hígado y pulmón.

## 1.2. Toxicidad por aparatos.

Toxicidad cardíaca: Dos pacientes desarrollaron sintomatología compatible con insuficiencia cardíaca congestiva. En uno el cuadro clínico y radiológico cedió con tratamiento médico oportuno, y el otro paciente desarrolló un edema agudo de pulmón que hizo necesaria la monitorización invasiva así como la administración de fármacos vasoactivos. En el resto de la serie no se presentaron otras complicaciones de relevancia.

Toxicidad vesical: Ningún paciente desarrolló cistitis hemorrágica.

Toxicidad renal: Solo se apreció alteración de la función renal en dos pacientes. En uno de ellos se observó un incremento de las cifras de creatinina del doble de sus valores basales con posterior normalización de las mismas con tratamiento apropiado; en el paciente restante el deterioro de la función renal fue progresivo requiriendo hemodiálisis y ultrafiltración. Ambos pacientes estaban recibiendo tratamiento simultáneo con agentes nefrotóxicos (aminoglucósidos y anfotericina B).

Toxicidad pulmonar: La toxicidad pulmonar más severa apareció en un enfermo que no había recuperado la neutropenia en el día +21 y en el que fue necesaria ventilación mecánica. Tanto los cultivos microbiológicos como las muestras de biopsia bronquial no demostraron la participación de ningún microorganismo.

Toxicidad hepática: En cuatro pacientes se desarrollaron alteraciones de la función hepática presentando tres de ellos alteraciones previas en sus niveles de transaminasas. Dos de estos pacientes desarrollaron un cuadro clínico de EVOH, de los cuales un paciente evolucionó favorablemente con normalización de las alteraciones analíticas, desaparición de la ascitis y hepatomegalia, mientras que el otro paciente falleció como consecuencia de un deterioro progresivo e irreversible de su función hepática. En los dos pacientes restantes la elevación de las transaminasas cursó de manera asintomática con posterior normalización.

Toxicidad del SNC: No se observó la aparición de toxicidad del SNC en ningún paciente.

Estomatitis: Algún grado de mucositis fue la única complicación que apareció en todos los enfermos, la mayoría de los cuales presentaron una forma leve que se controló con la analgesia habitual, mientras que cuatro pacientes desarrollaron mucositis intensa que requirió la administración de morfina.

Toxicidad gastrointestinal: Solo un paciente desarrolló toxicidad gastrointestinal con la aparición de diarrea acuosa leve sin sangre ni pus.



## 2. Otras complicaciones durante el transplante.

El resto de las complicaciones presentadas durante el transplante se resumen en la Tabla 31.

2.1. Infección: Dieciocho pacientes presentaron fiebre durante el periodo de aplasia postquimioterapia. En 12 casos se pudo constatar una etiología infecciosa, siendo documentados microbiológicamente nueve casos y clínicamente tres. Los restantes seis episodios fueron catalogados como infección posible. De los episodios con documentación microbiológica, ocho fueron bacteriemias y un caso de sinusitis maxilar por gram negativos. Los microorganismos aislados fueron: E. coli, Corynebacterium Jk, Pseudomonas maltophila, Pseudomonas aeruginosa (en dos ocasiones), Pseudomonas Picketti, Staphylococcus haemolyticus y un Staphylococcus coagulasa negativo. Sólo en un caso la infección estuvo implicada directamente en la muerte del paciente.

2.2 Hemorragia: Cinco pacientes presentaron complicaciones hemorrágicas leves (epistaxis, petequias y gingivorragias) mientras que en tres enfermos las manifestaciones hemorrágicas fueron graves (un caso de diatésis hemorrágica generalizada, un cuadro de hemorragia pulmonar y una hemorragia subaracnoidea). En estos pacientes se objetivó refractariedad a la transfusión de plaquetas de donantes al azar por lo que se procedió a la transfusión de plaquetas de

donante único. Los tres enfermos fallecieron a consecuencia de las complicaciones hemorrágicas.

#### LEUCEMIA MIELOBLASTICA AGUDA EN PRIMERA RC

##### Duración de la remisión.

Considerando la duración de la remisión desde el momento en que se alcanzó ésta tras finalizar el tratamiento de inducción, de los 15 pacientes con LMA transplantados en primera RC al cierre del análisis, cinco pacientes habían recaído, ocho continuaban en remisión de 8+ a 18+ meses y dos murieron en remisión como consecuencia de complicaciones infecciosas y hemorrágicas durante la aplasia postquimioterapia. La mediana actuarial de duración de la remisión fue de 13 meses, mientras que la probabilidad actuarial de permanecer en RC a los 18 meses es del 48±18%. En la actualidad permanecen en remisión continua ocho enfermos a los 8+, 10+, 11+, 11+, 12+, 13+, 14+ y 18+ meses.

Considerada desde la fecha del ATSP, la mediana de duración de la remisión es de 8 meses, mientras que la probabilidad actuarial de permanecer en remisión a los 16 meses es del 49±16% con una duración de la remisión para los ocho pacientes de 3+, 5+, 6+, 7+, 9+, 10+, 10+ y 16+ meses.

Las Figuras 10 y 11 muestran las curvas actuariales de duración de la remisión de los pacientes con LMA transplantados en primera RC.

#### Recidivas.

Cinco de los 15 enfermos transplantados habían recaído al cierre del estudio (3, 4, 6, 8 y 8 meses del ATSP). De nuevo, considerando la duración de la remisión desde la fecha en que se obtuvo la RC, las recidas aparecieron a los 6, 8, 8, 12 y 13 meses.

En todos los pacientes, la localización de la recidiva fue en médula ósea. En cuatro de los cinco enfermos se realizó un segundo autotransplante en situación de recidiva a partir de la médula criopreservada. Dos no obtuvieron remisión falleciendo uno de ellos a los 3 meses post TAMO encontrándose el otro vivo a los 4+ meses. Un paciente se encuentra en segunda RC a los 5+ meses y el paciente restante falleció por complicaciones infecciosas en las tres primeras semanas post transplante y en situación de aplasia medular.

#### Supervivencia.

La mediana actuarial de supervivencia aún no ha sido alcanzada. Desde la fecha del diagnóstico, la probabilidad actuarial de permanecer vivo a los 20 meses es del 70±10%,

mientras que desde el momento del ATSP la probabilidad actuarial de supervivencia a los 16 meses es del 70±12% (Figuras 12 y 13).

En el momento del análisis, cuatro de los 15 pacientes de este grupo habían muerto, y 11 continuaban vivos, nueve en primera RC, uno en segunda RC y uno en recaída medular entre los 8+ y 20+ meses desde el diagnóstico (8+, 11+, 12+, 13+, 13+, 14+, 16+, 16+, 17+, 19+ y 20+ meses respectivamente). De los cuatro pacientes fallecidos, dos lo hicieron en recaída y dos en primera remisión. Los dos pacientes muertos en recaída fallecieron tras TAMO. De los pacientes muertos en remisión, uno falleció por fracaso multiorgánico con recuperación hemoperiférica de dos series hemopoyéticas (mieloide y eritroide) y con un estudio medular que mostraba precursores de las tres líneas celulares. El paciente restante falleció en situación de aplasia medular grave a los nueve meses del diagnóstico y a los tres del ATSP.

#### **Supervivencia libre de enfermedad.**

En la Figura 14 está trazada la curva actuarial de supervivencia libre de enfermedad (SLE). La mediana actuarial fue de ocho meses, mientras que la probabilidad de sobrevivir en primera remisión fue del 43±15% a los 16 meses.

Figura 10. ATSP. Duración de la remisión desde fecha de RC.

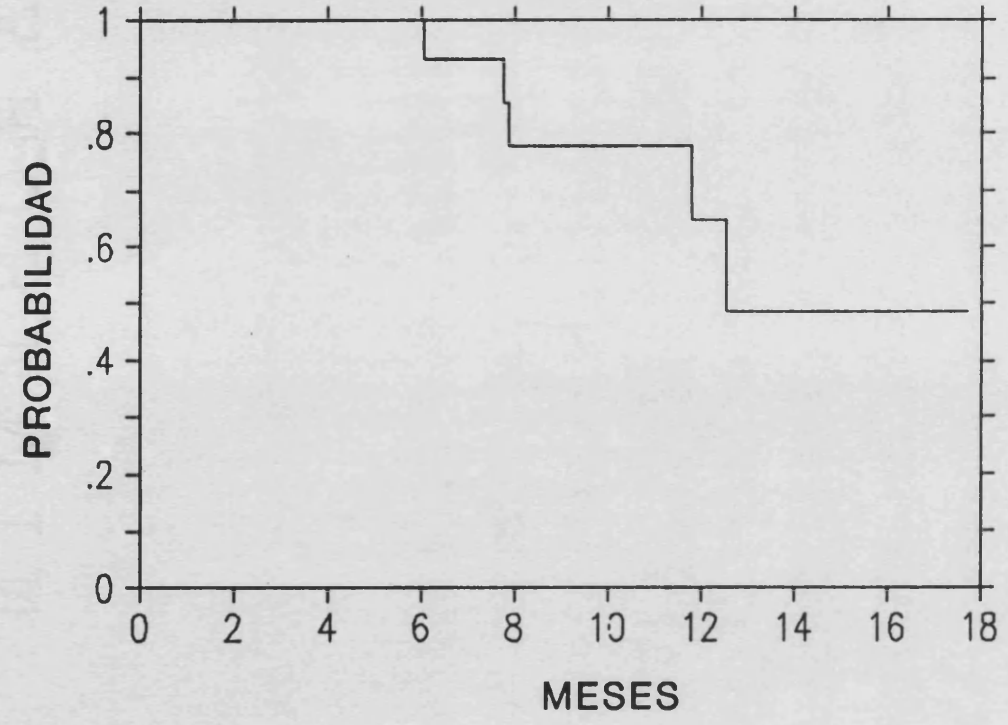


Figura 11. ATSP. Duración de la remisión desde fecha de transplante.

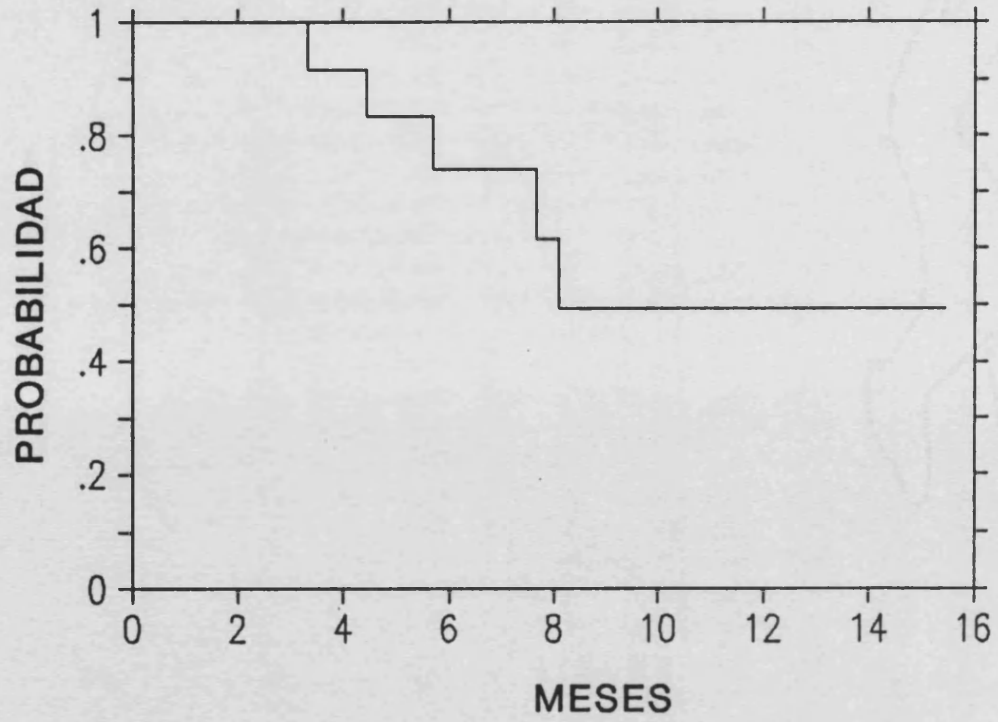


Figura 12. ATSP. Supervivencia desde diagnóstico.

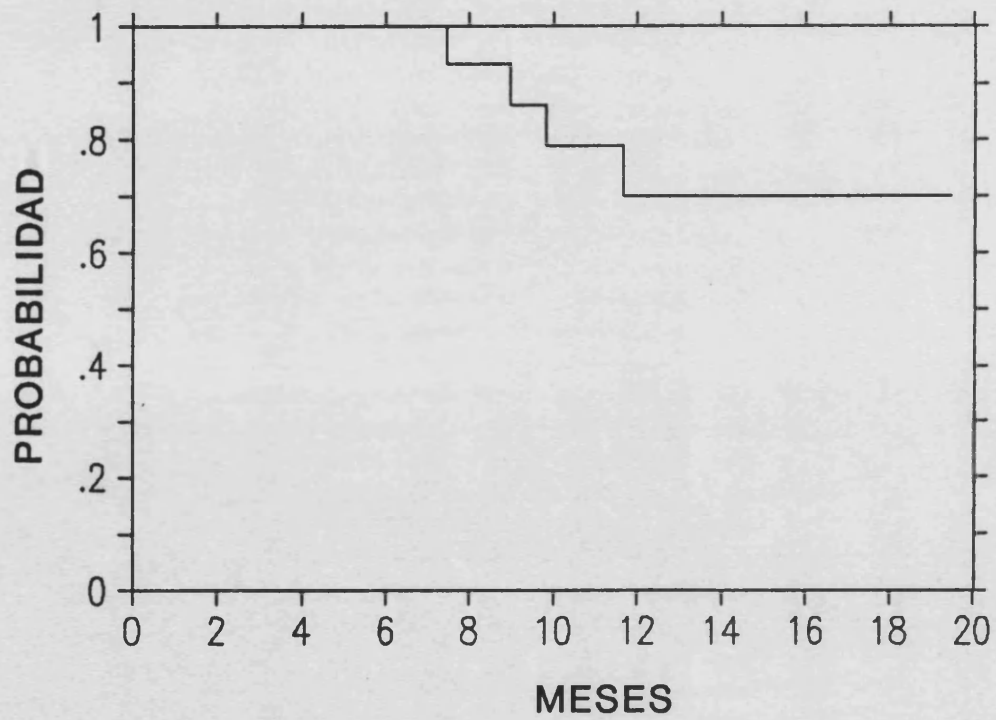


Figura 13. ATSP. Supervivencia desde transplante.

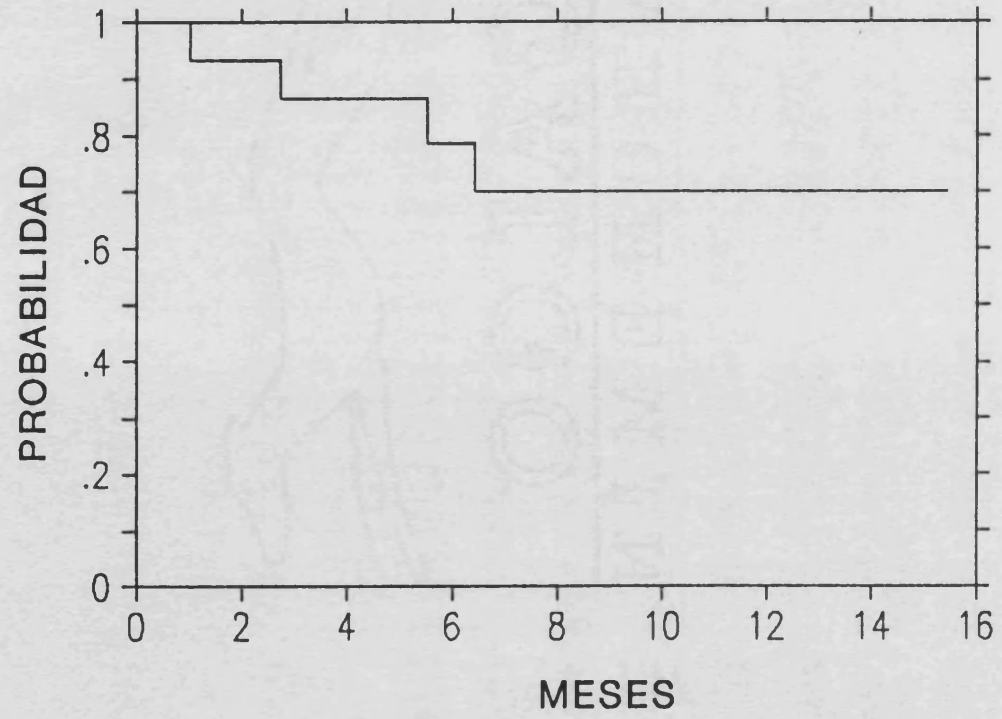
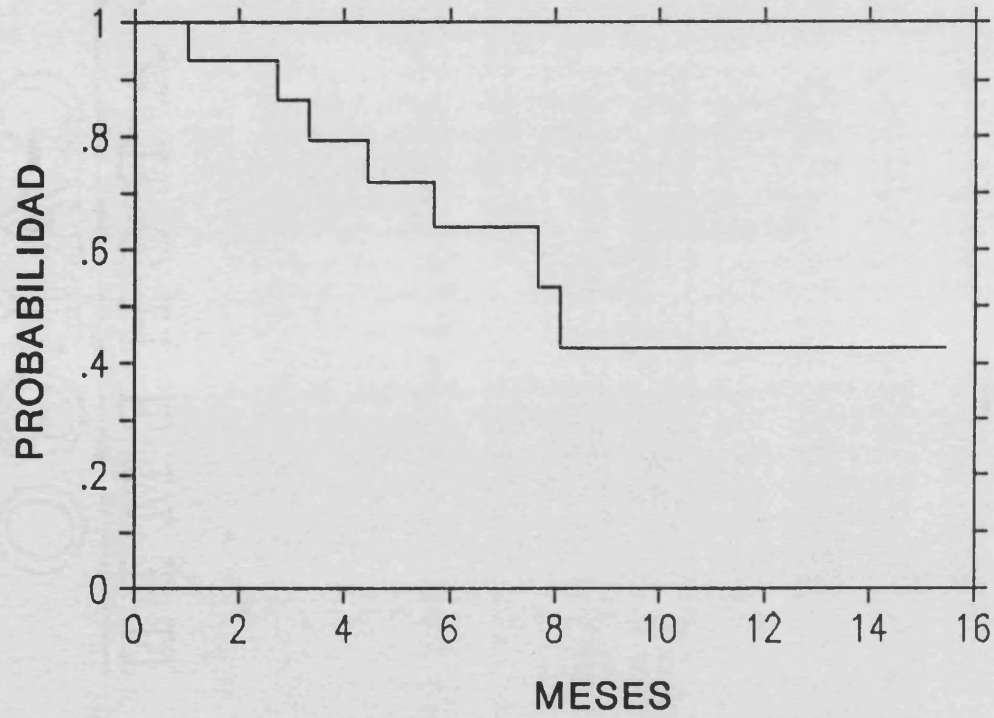




Figura 14. ATSP. Supervivencia libre de enfermedad.



**RESTO DE LA SERIE.**

Por lo reducido y heterógeno del resto de los enfermos de la serie, no se han trazado curvas de Kaplan-Meier, describiendo a continuación la evolución de este grupo de pacientes.

Duración de la remisión. Los dos pacientes transplantados en recidiva (LMA, LLA) no alcanzaron remisión; otros dos (LLA y EH) fallecieron por complicaciones hemorrágicas a los +105 y +42 días, uno de ellos sin signos de recuperación hemopoyética; los tres restantes (1 LMA y 2 LLA) permanecen vivos y en RC mantenida a los 2+, 10+ y 12+ meses.

Supervivencia. Cuatro enfermos (dos transplantados en recidiva con persistencia de la infiltración blástica) habían fallecido al cierre del estudio a los 1, 3, 4 y 4 meses del ATSP.

Los resultados y evolución del ATSP en ambos grupos de pacientes se presentan en la Tabla 32.

**COMPLICACIONES TARDIAS**

Tres pacientes (2 LMA, 1 LLA) presentaron fiebre y bacteriemia que se resolvieron con tratamiento antibiótico y retirada del catéter venoso central. Un paciente con LLA desarrolló una meningitis por Listeria monocytogenes que se resolvió sin secuelas con tratamiento antibiótico específico. Cuatro pacientes desarrollaron infecciones por virus Herpes zoster en el primer mes tras acabar la profilaxis que se resolvió rápidamente sin secuelas con aciclovir oral. Un paciente con LLA presentó a los 8 meses postransplante una necrosis avascular de cabeza de fémur que requirió intervención quirúrgica de revascularización, sin necesidad de sustitución protésica. Ningún enfermo ha presentado neumonía intersticial ni pérdida tardía del prendimiento.

TABLA 25. ATSP. CARACTERISTICAS GENERALES

Característica	Grupo A	Grupo B	Serie global
Pacientes	15	7	22
Edad (años)			
Mediana	33	18	29
Extremos	14-62	14-57	14-62
Sexo			
Varones	10	4	14
Mujeres	5	3	8
Diagnóstico			
LMA	15	2	17
M1	7		7
M2	1		1
M3	1	2	3
M4	3		3
M5	1		1
M6	1		1
M7	1		1
LLA		4	4
Común		1	1
T		2	2
B		1	1
EH		1	1
Citoféresis			
Mediana	6	6	6
Extremos	6-10		6-10
Intervalo RC-ATSP (días)			
Mediana	121	87	118
Extremos	60-172	44-157	44-172
CFU-GM ( $\times 10^4$ /kg)	17,2 $\pm$ 18,5	11,4 $\pm$ 12,4	15,4 $\pm$ 16,8
CMN ( $\times 10^8$ /kg)	6,8 $\pm$ 3,1	4,8 $\pm$ 1,2	6,1 $\pm$ 2,8

TABLA 26. DESCONGELACION E INFUSION DE CPSP. CARACTERISTICAS

	Mediana	Extremos
	-----	-----
Tiempo de descongelación (s)	56	40-160
Tiempo de administración (m)	4	3-6
Intervalo entre administraciones (h)	3	3-4
Duración de la administración (d)	1	1-2
Volumen total infundido (mL)	1.000	600-2.850
Volumen de hematíes infundido (mL)	37,4	16,3-171,2
Volumen de DMSO infundido (mL)	100	60-285

TABLA 27. ATSP. RECUPERACION HEMATOLOGICA (DIAS)

	Grupo A			Grupo B			Serie global		
	N	Mediana	Extr.	N	Mediana	Extr.	N	Mediana	Extr.
PMN >0,5x10 <sup>9</sup> /L	15	13	10-26	7	15	11-26	22	15	11-26
PMN >1x10 <sup>9</sup> /L	15	14	11-26	7	20	13-32	22	16	11-32
Plaq >20x10 <sup>9</sup> /L	14	16	7-94	5	53	16-233	19	16	7-233
Plaq >50x10 <sup>9</sup> /L	13	30	12-213	1	77	---	14	43	7-233
Plaq >100x10 <sup>9</sup> /L	10	77	25-140	1	93	---	9	72	25-140

TABLA 28. ATSP. CARACTERISTICAS DE LA MEDULA OSEA

Característica	Grupo A	Grupo B	Serie global
	N	N	N
<b>Celularidad cuantitativa</b>			
Seca	0	0	0
Pobre	11	5	16
Normal	4	1	5
<b>Celularidad cualitativa</b>			
<b>Serie eritroide</b>			
Presente	15	6	21
<b>Serie mieloide</b>			
Presente	15	6	21
<b>Serie Megacariocítica</b>			
Presente	9	2	11
<b>Blastos</b>			
Sí	0	2	2

TABLA 29. ATSP. CARACTERISTICAS DEL SOPORTE DE HEMODERIVADOS

	Grupo A	Grupo B	Serie global
<b>Unidades de C. Hematíes</b>			
Mediana	4	4	4
Extremos	0-8	3-8	0-8
<b>Unidades de C. Plaquetas</b>			
Mediana	24	86	20
Extremos	6-326	40-138	6-326

TABLA 30. ATSP. TOXICIDAD PROVOCADA POR EL ACONDICIONAMIENTO

	Grado I	Grado II	Grado III	Grado IV
Toxicidad Cardíaca	0	1	1	0
Toxicidad Vesical	0	0	0	0
Toxicidad Renal	0	1	0	1
Toxicidad Pulmonar	0	0	0	1
Toxicidad Hepática	2	1	1	0
Toxicidad Neurológica	0	0	0	0
Estomatitis	19	3	0	0
Toxicidad Digestiva	0	0	0	0

TABLA 31. ATSP. OTRAS COMPLICACIONES

	N
Pacientes	22
Episodios Infecciosos	19
Documentadas microbiologicamente	9
Documentadas clínicamente	4
Infección posible	6
Infección dudosa	0
Hemorragias	10
EVOH	2

TABLA 32. ATSP. RESULTADOS Y EVOLUCION

Característica	Grupo A	Grupo B	Serie Global
Pacientes	15	7	22
Prendimiento	15	6	21
Estable	13	6	19
No estable	2(2)*	0	2(2)
No prendimiento		1 (LLA)	1
Recidiva	5(4)*	0	5(4)
No RC	0	2 (LMA, LLA)	2
Exitus	4	4	8
En aplasia	1	1 (LLA)	2
Con recuperación hematológica	1	1 (EH)	2
Por recidiva	2	0	2
No RC	0	2 (LMA, LLA)	2

(\*) Pacientes en los que se infundió médula ósea.



## **DISCUSSION**

---

Tras el primer ensayo clínico que demostró la existencia de células progenitoras circulantes en sangre de animales (EPSTEIN y cols. 1966), ulteriores investigaciones mostraron que la recolección y posterior infusión de la fracción de CMN de sangre eran capaces de restablecer la función hemopoyética e inmune medular tras quimio y/o radioterapia, tanto si se administraban de forma autóloga como alogénica (KÖRBLING y cols. 1979, ABRAMS y cols. 1981). Los primeros intentos de reproducir en seres humanos estos experimentos fracasaron en su empeño de lograr una recuperación hemopoyética mantenida debido al escaso número de CPSP circulantes en condiciones basales (uno o dos grados de magnitud inferior a las presentes en médula). Sin embargo, la demostración del importante incremento de CPSP tras la administración de quimioterapia (RICHMAN y cols. 1976, LOHRMAN y cols. 1978) y de la presencia en cultivos de precursores de las diferentes líneas hemopoyéticas en sangre (FAUSSER & MESSNER 1978, VERMA y cols. 1980) fueron los pilares que permitieron el desarrollo de los primeros ensayos en seres humanos en los que se emplearon CPSP como rescate de una aplasia medular tras tratamiento citorreductor. Por último, el uso de separadores celulares para la recolección de la fracción de CMN y el desarrollo de técnicas de criopreservación, han permitido considerar al ATSP como una alternativa terapéutica eficaz y cada vez más usada para el tratamiento de una gran variedad de neoplasias

(LASKY 1989c, HENON y cols. 1991). Concretamente en LMA, inicialmente la mayoría de ensayos se realizaron en pacientes en recaída (REIFFERS y cols. 1985, JUTTNER y cols. 1985, TO y cols. 1987, REIFFERS y cols. 1988). Sin embargo, y una vez confirmada la capacidad de regeneración hemopoyética estable de estos precursores celulares, el paso siguiente ha sido considerar su empleo en pacientes en primera RC como alternativa al trasplante autólogo de médula ósea.

En esta Tesis se describen los resultados del programa de ATSP en diferentes hemopatías malignas con especial atención a la LMA en primera RC, analizando los diversos aspectos del mismo especialmente los referentes a la recolección y posterior infusión de CPSP. En el curso evolutivo de los pacientes transplantados se hace referencia al análisis de la recuperación hemopoyética y al estudio de las complicaciones y mortalidad del procedimiento. Por último, y aunque el seguimiento de los pacientes es aún corto, se hace una evaluación de la eficacia antileucémica del ATSP.

En tumores sólidos, donde la recolección de CPSP habitualmente se realiza en condiciones basales, la cinética de recuperación de los parámetros hemoperiféricos es equivalente a la encontrada tras un TAMO (KESSINGER y cols. 1988 y 1989, LASKY y cols. 1989, HENRIQUEZ 1991). Sin embargo, en leucemia aguda esta recolección se efectúa

habitualmente tras la movilización de precursores a sangre, siendo la técnica más empleada la administración de quimioterapia, existiendo al parecer una relación directa entre la intensidad de la aplasia provocada por la quimioterapia y la cantidad de progenitores recolectados (REIFFERS y cols. 1989). Sin embargo, los esquemas empleados para estas movilizaciones se acompañan de importante morbilidad e incluso mortalidad (TO y cols. 1990b). En los pacientes de nuestra serie, el tratamiento quimioterápico empleado para la recolección ha sido el habitual en nuestro servicio para la inducción a la remisión. En otras enfermedades se han empleado diferentes protocolos en función del estado clínico y evolutivo de los enfermos. La administración de ciclos adicionales de quimioterapia (COAP) en aquellos pacientes en que fue necesario fue generalmente bien tolerado no provocando mortalidad y administrándose en régimen ambulatorio. Los rendimientos de CMN en los enfermos de nuestra serie fueron similares a los obtenidos con esquemas mucho más agresivos y superiores a los referidos por otros autores con terapias parecidas (CRAIG y cols. 1990). Otra técnica de movilización ocasionalmente empleada por otros autores ha sido la administración de G-CSF y GM-CSF (DÜHRSEN y cols. 1988, SOCINSKY y cols. 1988, GIANNI y cols. 1990, RAVAGNANI y cols. 1990). Aunque se ha evidenciado un importante incremento en la cifra de CFU-GM recolectadas no se han demostrado diferencias en la rapidez y estabilidad de la recuperación hemopoyética entre las CPSP

recolectados con o sin factores de crecimiento.

La elección de la fase de recuperación acelerada de la hemopoyesis tras el tratamiento quimioterápico basándose en parámetros de sangre periférica (leucocitos de 800-1.000/ $\mu$ L y monocitosis superior al 30%), es una sencilla determinación, de observación prácticamente constante (dejó de observarse en cuatro casos), ha permitido la obtención de cifras de CMN equivalentes a las de otras series (STIFF y cols. 1987). Para la recolección de células progenitoras se han empleado fundamentalmente dos máquinas separadoras: Fenwal CS-3000 (158 sesiones) y Cobe Spectra (25 sesiones). Con respecto a la primera, se trata de una separadora de flujo continuo de efectividad probada en la recolección de plaquetas y granulocitos (ABRAMS y cols. 1977, KÖRBLING y cols. 1977) que permite un completo y cerrado sistema de recolección, evitando la posibilidad de contaminación. Dos han sido los programas empleados por los diferentes autores en este separador para la recolección de la fracción de CMN. El programa 1 de plaquetoféresis con ligeras modificaciones y el programa 3 (leucocitos). En nuestra serie se ha utilizado el programa 1 de acuerdo a las instrucciones establecidas en el manual del operador con ligeras modificaciones descritas en el apartado de material y métodos según las recomendaciones de CARTER y cols. (1987). Con este programa se obtuvo una escasa contaminación de hematíes (hemoglobina de 1,7 g/dL) y granulocitos ( $4,6 \times 10^9$ /L), lo que coincide con lo publicado en la literatura

con un porcentaje de CMN recolectados del  $75 \pm 38\%$  y un rendimiento de CMN de  $0,9 \times 10^6$ /kg por sesión, resultados similares a los de otros autores (LASKY y cols 1989a y 1989b, ESPIGADO y cols. 1989, LASKY y cols. 1991). No obstante el índice de recuperación obtenido ( $55 \pm 17\%$ ) fue algo más bajo que lo publicado por otros grupos (RODRIGUEZ y cols. 1989). Estas diferencias podrían deberse a una distinta interpretación de este índice de recuperación que se ha calculado con una fórmula distinta. El cálculo de la recuperación de CMN realizado por RODRIGUEZ y cols. (1989) considera la volemia del paciente en vez del volumen procesado, teniendo como repercusión una duplicación del denominador de la fórmula aplicada. A nuestro juicio, el cálculo hecho sobre el volumen procesado refleja de manera más exacta la eficacia de la recolección. Junto al alto rendimiento de CMN, se observaron escasas repercusiones entre los hemogramas pre y postrecolección, existiendo las diferencias más acusadas en la cifra de plaquetas. En este sentido y para evitar la aparición de trombopenias importantes postféresis, inicialmente se realizó una centrifugación lenta del contenido final de la cámara de recolección y su infusión al paciente. Sin embargo, la detección de CMN entre el material a reinfundir modificó nuestra actitud en ese sentido, procediéndose a la transfusión de concentrado de plaquetas postrecolección cuando fue necesario. Además la presencia de cierta contaminación plaquetar entre las CMN no repercutió

negativamente ni en la criopreservación ni en la infusión del material recolectado.

Por último, el procedimiento no presentó excesivos problemas técnicos detectándose obstrucciones de las vías de acceso en 11 ocasiones, lo que contrasta con la elevada frecuencia de estos mismos problemas referido por otros autores (HAIRE y cols. 1990).

La media de CMN recolectadas en nuestra serie se encuentra dentro de los valores publicados por la literatura (Tabla 32). Así, REIFFERS y cols. (1986) obtienen tras seis citaféresis una cifra de CMN de  $5,6 \times 10^8$ /kg en seis pacientes, algo inferior a nuestros rendimientos, mientras que el grupo del Hospital Saint Louis refiere unos rendimientos de  $2,6 \times 10^8$  CMN/kg tras una media de tres recolecciones por paciente en un grupo de 22 pacientes con LMA en primera RC y de  $1,8 \times 10^8$ /kg en 17 enfermos con LLA también en primera RC (CASTAIGNE y cols. 1988). JUTTNER y cols. (1990) en pacientes con LMA en primera RC obtienen  $5,7 \times 10^8$  CMN/kg tras 3-5 féresis con un separador CS-3000 y KÖRBLING y cols (1990a) refieren un número de  $8,7 \times 10^8$ /kg en 20 pacientes con LMA en primera RC. Más recientemente este grupo infunde  $8 \times 10^8$  CMN/kg obtenidas en 10 citoféresis en una serie de 20 pacientes con LMA en primera remisión en los que compara los resultados de la recuperación hemopoyética entre ATSP y TAMO purgado con mafosfamida (KÖRBLING y cols. 1991). En tumores sólidos, STIFF y cols. (1987) en ocho enfermos con neoplasias pulmonares infunde  $3,8 \times 10^8$  células

nucleadas/kg tras dos féresis realizadas en el periodo de recuperación hemopoyética acelerada postquimioterapia, mientras que KESSINGER y cols. (1988) en una serie de 40 pacientes con linfoma infunden una media de  $7 \times 10^8$  CMN/kg tras ocho sesiones de recolección obtenidas sin movilización. En linfomas en recaída, KÖRBLING y cols (1990b) infunden entre  $1,7$  y  $22,7 \times 10^8$  CMN/kg (media  $7,5$ ) obtenidas tras una media de 13 recolecciones y una movilización previa de precursores con quimioterapia (8 casos) o con factores de crecimiento (4 casos). Por último, también en tumores sólidos en una serie más heterogénea de 50 pacientes, el grupo de la Clínica Universitaria de Navarra obtiene un número de CMN de  $6-13 \times 10^8$  /kg tras cuatro recolecciones sin movilización previa de precursores (HENRIQUEZ 1991). Este paralelismo en los valores de CMN obtenidos por los diferentes grupos no se reproduce cuando hacemos referencia a las cifras de CFU-GM, habiéndose conseguido resultados igualmente satisfactorios con cifras de CFU-GM muy variables (Tabla 32). En los enfermos sometidos a recolección de CPSP en esta serie el número medio de CFU-GM obtenido en los enfermos transplantados fue de  $15,3 \pm 16,7 \times 10^4$  /kg ( $17,2 \pm 198,5$  en LMA), habiendo observado la existencia de una correlación significativa entre la cifra de CFU-GM administradas y la velocidad de recuperación hemopoyética, especialmente de la granulopoyesis, lo que coincide con otros autores que infunden cifras mucho más altas de CFU-GM (JUTTNER y cols. 1990, TO y cols. 1990b).



Sin embargo, a diferencia de lo referido por TO y cols. (1986 y 1987) no hemos observado la existencia de esta relación en cuanto a la viabilidad del injerto se refiere, habiendo logrado prendimientos estables con cifras de CFU-GM inferiores a  $5 \times 10^4$  /kg. Por lo tanto, puesto que la cifra mínima de CFU-GM que se precisa infundir para una reconstitución hematológica completa y duradera no está establecida, su empleo como indicador de la capacidad de reconstitución hemopoyética del ATSP es difícilmente generalizable. Gran parte de esta dificultad se deriva de la propia naturaleza de la técnica. En el presente trabajo las CFU-GM se han cultivado empleando placenta como factor estimulante de colonias manteniendo los cultivos en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y a 37° C, sin embargo en otros trabajos, como factor estimulante del crecimiento se han empleado inmunomoduladores (G-CSF, GM-CSF y factores de crecimiento multilineales), medio condicionante leucocitario con fitohemaglutinina, etc. Incluso las condiciones de incubación son variables ( 5% ó 20% de O<sub>2</sub>, 4%, 5% ó 7,5% de CO<sub>2</sub>). Por último, la composición de otros de los componentes empleados en los cultivos (agentes reductores, esteroides, etc) hace que las cifras de CFU-GM obtenidas no sean comparables de una serie a otra.

Todo esto hace que el índice idóneo que garantice una rápida y estable recuperación hemopoyética sea una cuestión aún no resuelta, por lo que algunos autores prefieren usar, como en el TAMO, la cifra de CMN como indicador del número

adecuado de células progenitoras (KESSINGER y cols. 1988 y 1989). Un temor expresado por otros (BELL y cols. 1987) en el sentido de que las recolecciones se realizasen a expensas de precursores comprometidos y no de verdaderas células pluripotentes puede, hoy en día, considerarse sin fundamento. Efectivamente, y aunque no se dispone de técnicas capaces de cultivar los progenitores pluripotentes más indiferenciados, los resultados publicados no han evidenciado una aplasia tardía tras la administración de CPSP aunque sí se han citado prendimientos incompletos (GIANNI y cols. 1989b). En nuestra serie se han observado tres fracasos en el prendimiento, uno de ellos en un paciente con LLA en tercera RC. En este caso, probablemente la recirculación de progenitores fuese mucho menor que en pacientes menos tratados, como si la mielosupresión repetida hubiese reducido la reserva medular de precursores. Los otros dos casos restantes son pacientes con LMA en primera RC, en los que las dosis de CFU-GM fueron 1,5 y  $29,9 \times 10^4$  /kg respectivamente, por lo que resulta muy difícil predecir que factores entre las células infundidas, o en el propio microambiente medular, pueden influir en la diferente movilización y viabilidad de células pluripotenciales, pero que no necesariamente guardan una relación directa con los precursores comprometidos cultivados (CFU-GM). La solución a este problema, como ha sido sugerido por algunos autores, podría ser la determinación de células CD34+ entre las células recolectadas, como más fieles indicadores de la

presencia de células pluripotenciales (BERENSON y cols. 1988, TO y cols. 1990, SIENA y cols. 1991). En nuestro trabajo no hemos analizado la relación entre el número de CD34 y la recuperación hemopoyética por disponer de aún de datos muy preliminares, pero en los casos en los que se efectuó esta determinación hemos detectado unos niveles equivalentes a los referidos en la literatura (SIENA y cols. 1991). Si estos estudios se confirman en la práctica clínica, los niveles de células CD34+ podrían ser usadas como garantía de prendimiento, siendo una determinación fácilmente reproducible, que nos permita una mejor "selección" de las recolecciones evitando sesiones innecesarias al identificar de manera mucho más exacta el momento adecuado para iniciarlas.

No obstante, aunque la cuestión de la existencia del número mínimo de células recolectadas y su identificación sigue sin estar resuelta, este podría ser un problema menor si, como han sugerido diferentes autores (GALE y cols. 1990, HENON y cols. 1991) la reconstitución hemopoyética a largo plazo se realizase a partir de las células pluripotentes supervivientes tras el acondicionamiento pre-ATSP. Efectivamente, los acondicionamientos pretransplante no aseguran la erradicación total de las células hemopoyéticas del receptor por lo que las células infundidas con el ATSP, según esta hipótesis, simplemente producirían una reconstitución hemopoyética precoz y transitoria que sería seguida por la recuperación definitiva a partir de la

población medular autóloga residual.

El sistema de criopreservación empleado en nuestra serie es similar al referido por otros autores (JUTTNER y cols. 1985, KÖRBLING y cols. 1986, KESSINGER y cols. 1988 y 1989, LASKY y cols. 1989a y 1989b, KÖRBLING y cols. 1990, PHILLIPS y cols. 1990, KÖRBLING y cols. 1991, LOPEZ y cols. 1991) conservando las células recolectadas en nitrógeno líquido tras un enfriamiento gradual para evitar la cristalización intracelular hasta la liberación del calor de fusión, que corresponde al paso del estado líquido al sólido y que se produce a  $-7^{\circ}$  C. Del mismo modo, la presencia de proteínas en el medio de congelación a una concentración del 5-10% parece ejercer un efecto protector durante la congelación, alcanzando una viabilidad postcongelación del 89% muy por encima del mínimo que garantice una recuperación hemopoyética (DOUAY y cols. 1986). El sistema empleado para la descongelación en baño a  $37^{\circ}$  C, en la misma sala del enfermo con objeto de proceder a su administración lo más rápidamente posible, pretendió evitar la agregación celular frecuentemente descrita con la manipulación "in vitro" de las CMN criopreservadas (LASKY, 1989c). Simultáneamente, la rapidez en la descongelación (56 seg) e infusión (4 min), redujo al mínimo la exposición del material a los efectos del DMSO en estado líquido. La administración fue generalmente muy bien tolerada sin la aparición de toxicidad relevante. Además el intervalo entre administraciones (3-4 h) evitó los problemas de sobrecarga líquida que pudieran

presentarse especialmente en los pacientes de más edad. A diferencia de lo publicado por otros autores (KESSINGER y cols. 1989a y 1989b, HENRIQUEZ, 1991), no se detectó hemoglobinuria ni fiebre asociada a la infusión permaneciendo, asimismo, los niveles de creatinina en todo momento dentro de límites normales. Es probable que el escaso volumen de hematíes administrado en nuestra serie haya tenido un papel decisivo en la reducción de estas complicaciones al mínimo.

Durante la administración de altas dosis de busulfan en 19 casos condicionados con Cy-Bu no se registraron episodios de toxicidad neurológica ocasionalmente citados incluso en pacientes con profilaxis antiepiléptica (GRIGG y cols. 1989, DE LA CAMARA y cols. 1991). Efectivamente, dada su rápida penetración en líquido cefalorraquídeo, el Bu alcanza en SNC unos niveles similares a los plasmáticos que persisten hasta 24 horas tras cesar el tratamiento, por lo que la profilaxis anticomicial debe prolongarse 24-48 horas después de la última dosis. En nuestros pacientes la administración de difenilhidantoína por vía oral desde 24 horas antes de iniciar el acondicionamiento hasta 48 horas después de finalizarlo, para mantener unos niveles del antiepiléptico más allá del efecto del Bu, se mostró como una medida profiláctica eficaz. De otras complicaciones graves no se documentó ningún caso (cistitis hemorrágica) o aparecieron escasamente (EVOH, dos casos). Otros trabajos han referido una incidencia elevada de cistitis hemorrágica (hasta el

30%, MORGAN y cols. 1991) con esquemas similares. Esta diferencia probablemente sea debida al empleo por éstos autores de técnicas como las irrigaciones vesicales y, a nuestro juicio la falta de empleo de mesna profiláctico. La EVOH apareció en dos pacientes con niveles elevados de transaminasas antes del ATSP, por lo que creemos que este fue un factor de riesgo determinante de esta complicación. Uno de ellos falleció a consecuencia de un fracaso multiorgánico con cifras elevadas de bilirrubina y creatinina, mientras que el tratamiento diurético y la restricción de sodio contribuyó a la resolución de esta complicación en el paciente restante. En los tres pacientes que recibieron un régimen diferente de acondicionamiento, solo se documentó una complicación mortal en el paciente con EH por un cuadro de neumonitis intersticial y en el que pudo tener un papel importante la toxicidad pulmonar asociada al tratamiento radioterápico previo. Por último, la única complicación aparecida en casi todos los pacientes fue la mucositis que se controló generalmente con tratamiento analgésico sin necesitar la aplicación de terapias más agresivas.

Por otro lado, a pesar de la neutropenia severa alcanzada por todos los enfermos, cuatro casos no desarrollaron ningún episodio infeccioso en el postransplante inmediato, y los 18 pacientes restantes tuvieron infecciones bacterianas y la mayoría se controlaron con tratamiento antibiótico de amplio espectro. Parece, sin duda, que en

este comportamiento jugó un papel crucial la rápida recuperación de la neutropenia. De hecho, la muerte estuvo causada directamente por problemas sépticos solo en un paciente que permanecía con neutropenia grave 50 días después del ATSP y que desarrolló una septicemia por Pseudomonas aeruginosa. Las hemorragias fueron frecuentes (10 pacientes) pero habitualmente leves. En dos de los tres pacientes que presentaron las complicaciones hemorrágicas más graves (una hemorragia pulmonar y otra subaracnoidea), se evidenció una refractariedad a la transfusiones de plaquetas de donantes al azar. La baja incidencia de complicaciones peritransplante se tradujo en nuestra experiencia, al igual que en la de otros (LASKY y cols. 1989b, KÖRBLING y cols. 1991) en una corta estancia hospitalaria.

Efectivamente, una de las principales ventajas del ATSP frente al TAMO radica en la mayor rapidez de la recuperación de la hematopoyesis, especialmente de la granulopoyesis. Nuestros datos confirman la precocidad de la recuperación de la cifra de PMN y plaquetas. La mediana de tiempo hasta alcanzar  $1 \times 10^9$  PMN/L y  $50 \times 10^9$  plaquetas/L en los pacientes con LMA, 14 y 30 días respectivamente, son comparativamente inferiores a las observadas en TAMO (KÖRBLING y cols. 1991, REIFFERS y cols. 1991b). Además ésta recuperación de la serie granulocítica fue generalizada con un tiempo hasta alcanzar  $>0,5 \times 10^9$  PMN/L superponible a la de la mayoría de los autores (13 días en los pacientes con LMA y 15 días para

el resto de la serie). Así, el grupo del Saint Louis de París refiere unas cifras de PMN superiores a  $0,5 \times 10^9 / L$  en un tiempo medio de 12 días (CASTAIGNE y cols. 1988), mientras que REIFFERS y cols. (1986) en cinco pacientes con LMA en primera RC alcanzan estos valores entre 10 y 16 días. También en LMA en primera RC, JUTTNER y cols. (1990) refieren cifras de recuperación de neutropenia de 11 días. En un grupo de pacientes más heterogéneo un grupo italiano ha publicado unos resultados muy similares (IACONE y cols. 1990) reproducidos por otros autores (KÖRBLING y cols. 1990). En la mayoría de los trabajos en los que se establece una comparación en la velocidad de reconstitución hemopoyética frente al TAMO ésta es favorable al primero (REIFFERS y cols. 1990, KÖRBLING y cols. 1991). Se ha especulado que el ATSP aportaría un mayor número de precursores ya comprometidos, que precisarían un menor tiempo para diferenciarse y repoblar la médula ósea, por lo que esta acelerada recuperación hemopoyética sería debida a la infusión tanto de precursores diferenciados, responsables de la rápida recuperación inicial, como de células pluripotentes responsables de una hemopoyesis permanente. En este sentido, actualmente es difícil conocer que papel juegan los distintos progenitores transfundidos y que influencia puede tener la hemopoyesis residual postquimioterapia.



En la mayoría de los estudios, la recidiva leucémica sigue siendo la principal causa de muerte. En nuestra serie, de 15 enfermos con LMA en primera RC hasta la actualidad han recaído 5 enfermos, habiendo fallecido dos en RC, con lo que la SLE es de un  $43 \pm 15\%$  a los 16 meses, similar a la referida por otros autores (REIFFERS y cols. 1990, KÖRBLING y cols. 1991). Debido a la existencia de un equilibrio dinámico de las células "tronco" entre los compartimentos intra y extravascular se puede especular que las células neoplásicas restantes en médula de pacientes en RC circulen en menor cantidad que los elementos sanos. Sin embargo, esto no ha podido ser todavía demostrado, por lo que el problema de la mayor o menor contaminación leucémica en las CPSP y, por tanto, el riesgo de recidiva leucémica tras su infusión no está definitivamente resuelto. Sin embargo, en la actualidad no hay datos que hagan sospechar que esta contaminación sea superior a la de la médula ósea. De hecho, resultados preliminares de estudios no randomizados entre ATSP y TAMO no han mostrado diferencias en cuanto al número de recaídas entre ambos grupos (JUTTNER y cols. 1990, REIFFERS y cols. 1991b, KÖRBLING y cols. 1991). En cualquier caso, existe la dificultad de distinguir en una recidiva si ha sido ocasionada por una contaminación tumoral del injerto o por de enfermedad residual. Pobablemente, la mayoría de las recaídas postransplante dependan de una incapacidad de los regímenes de acondicionamiento actuales de erradicar la población tumoral en el receptor, más que de una hipotética

contaminación tumoral del injerto. Resultados preliminares sugieren que el empleo de etopósido en lugar de Cy en combinación con radioterapia (SNYDER y cols. 1991) o Bu (LINKER y cols. 1991) podrían tener mayor eficacia antileucémica con una toxicidad aceptable. Otra posibilidad de mejorar los resultados es manipular la respuesta inmunológica antileucémica del huésped. En este sentido, dos vías a investigar en el ATSP, como en el TAMO, son la administración de interleucina-2 para activar la reconstitución linfoide y producir una reacción antileucémica (BLAISE y cols. 1990) y la inducción de enfermedad injerto-contra-huésped autóloga para conseguir un efecto injerto-contra-leucemia mediante el uso de ciclosporina A (JONES y cols. 1989). También es posible que el momento de la recolección medular juegue un papel importante. Aunque en nuestra serie la recogida de CPSP se realizó tras la inducción y la consolidación, se ha sugerido que podría ser preferible que la recolección de CPSP para el ATSP se efectuara después de la consolidación, especialmente cuando se realizan técnicas de movilización (LAPORTE y cols. 1987). Sin embargo, la ventaja de esta propuesta no está demostrada.

Los resultados de esta Tesis confirman la movilización y recolección de un número suficiente de CPSP con las técnicas empleadas, la viabilidad del ATSP en leucemia aguda, especialmente LMA, la reconstitución hemopoyética precoz y mantenida, especialmente de la granulopoyesis

---

incluso en pacientes en segunda o ulterior RC y la escasa toxicidad del procedimiento. Asimismo, estos resultados sugieren una eficacia antitumoral del ATSP equivalente a la obtenida por otras modalidades de transplante autólogo (TAMO) siendo necesario incorporar nuevas medidas terapéuticas encaminadas a reducir las recaídas.

TABLA 32. RESULTADOS TERAPEUTICOS EN DISTINTAS SERIES DE ATSP

Referencia	Pacientes (N)	CMN $\times 10^8$ /kg	CFU-GM $\times 10^4$ /kg	Días post-ATSP	
				PMN $>0,5 \times 10^9$ /L	Plaq. $>50 \times 10^9$ /L
Reiffers (1986)	6	5,6	30	10	34
Reiffers (1988)	5	NI	15,1	11	20
Castaigne (1988)	23	2,6	4,2	12	29
Castaigne (1988)	15	1,8	1,6	26	56
Kessinger (1988)	10	8,4	8	22	NI
Kessinger (1989)	40	7	0,6	25	NI
Lasky (1989)	7	6,4	NI	18	NI
Juttner (1990)	22	5,7	77	11	14
Iacone (1990)	22	NI	4,7	12	16
Körbling (1990)	12	5,9	0,9	20	NI
Körbling (1991)	20	8	2,3	14	NI
EBMT (1991)	28	NI	NI	15	58
Henríquez (1991)	50	6-13	NI	27	NI
Esta serie					
Grupo A	15	6,8	17,2	13	30
Grupo B	7	4,8	11,4	15	77
Global	22	6,1	15,4	15	43

NI: No Indicada.

## **CONCLUSIONES**

---

1. La quimioterapia, el momento elegido para realizar la recolección de CMN, los métodos de aféresis utilizados y, en definitiva, todas las medidas empleadas han procurado una movilización y recolección de una cantidad de CMN y precursores hemopoyéticos adecuada a los objetivos.

2. Los rendimientos de CMN y CFU-GM con los diferentes métodos empleados no han puesto de manifiesto, por el momento, diferencias apreciables.

3. La tolerancia a las citoféresis ha sido excelente en la mayoría de los casos, siendo las escasas complicaciones asociadas al procedimiento leves y de fácil manejo.

4. La infusión de las células criopreservadas ha estado exenta de complicaciones de relevancia, siendo suficientes en todos los casos las medidas utilizadas para la profilaxis de la hipervolemia y toxicidad del DMSO.

5. La sencillez y facilidad en la obtención de los progenitores hematopoyéticos, así como la poca toxicidad observada durante su administración, hace del procedimiento una técnica aplicable incluso en pacientes de edad avanzada.

---

6. El autoinjerto de precursores hematopoyéticos de sangre periférica se sigue de una rápida recuperación hemopoyética, especialmente de la línea granulocítica, con un bajo riesgo de infecciones en el periodo inmediato postransplante.

7. Hemos encontrado una relación significativa entre el número de precursores granulomonocíticos administrados (CFU-GM) con la rapidez de la recuperación hemopoyética, especialmente con la granulopoyesis.

8. La incidencia de prendimientos inestables fue escasa (tres pacientes) y su causa no bien establecida.

9. El autoinjerto de células hematopoyéticas de sangre periférica hace viable la administración de megaterapias de acondicionamiento similares a las empleadas en otras modalidades de transplante de médula ósea.

10. El acondicionamiento al transplante con busulfan y ciclofosfamida ha sido bien tolerado y su potencial erradicativo deberá evaluarse a más largo plazo.

11. La proporción de pacientes que han recaído tras un autoinjerto de células hematopoyéticas de sangre periférica hace necesaria la investigación de técnicas que permitan

---

detectar la eventual presencia de células tumorales en el injerto y/o la persistencia de población neoplásica residual en los pacientes.

12. Los resultados preliminares en pacientes con leucemia aguda en primera remisión son alentadores. Sin embargo, el corto seguimiento nos impide evaluar aún apropiadamente su eventual potencial curativo.



## RESUMEN

El ATSP es una variedad de autotransplante en el que el injerto tiene lugar a partir de precursores hemopoyéticos circulantes en sangre. Sin embargo, el escaso número de estos progenitores en sangre hace necesario el empleo de métodos que permitan un importante incremento de los mismos para su recolección. Esta movilización de precursores hematopoyéticos a la sangre se produce habitualmente mediante la administración de quimioterapia alcanzándose unos niveles de CPSP de 10-30 veces su valor basal.

En esta Tesis se presentan los resultados del ATSP en pacientes con hemopatías malignas haciendo especial referencia a la LMA en primera remisión.

Se han realizado 186 sesiones de recogida de células en 34 pacientes (22 varones y 12 mujeres) con una edad entre 12 y 65 años (media 37). Por diagnósticos, el más frecuente fue la leucemia aguda (29 casos, 24 LMA y 5 LLA); siendo los casos restantes mielomas (tres casos) y linfomas (un caso de LNH y otro de EH). Las recolecciones se realizaron en dos ciclos de 3-4 sesiones (media de seis sesiones por enfermo) coincidiendo con el periodo de recuperación rápida de la hemopoyesis postquimioterapia (mediana: día 17).

Los separadores empleados para la recolección fueron el Fenwal CS-3000 (158 sesiones) y el Cobe Spectra (25 sesiones), ambos de flujo continuo. Los rendimientos de CFU-GM y CMN por sesión fueron de  $0,8 \times 10^4$  /kg (extremos 0-61) y  $0,787 \times 10^8$  /kg (extremos 0-5,6) respectivamente, con escasa contaminación hemática (hemoglobina media de 1,7 g/dL). No

se observaron complicaciones importantes durante la recolección, y solo en una ocasión fue necesario suspenderla por la aparición de un episodio de hematemesis en un paciente con ulcus duodenal.

Las CPSP se suspendieron para la congelación en una solución de albúmina al 5% y DMSO al 10%. El almacenamiento se hizo en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}$  C hasta su empleo. En 21 pacientes se extrajo también médula ósea como reserva.

Se efectuaron un total de 22 ATSP que hemos analizado separadamente en dos grupos: el grupo A formado por 15 pacientes con LMA en primera remisión, y el grupo B con siete pacientes (tres LLA en segunda o posterior remisión, una LLA en recidiva, una LMA en segunda RC, una LMA en recidiva y una EH). Catorce fueron hombres y ocho mujeres, con edades entre 16 y 62 años (media 29). Diecinueve pacientes fueron acondicionados con Cy (50 mg/kg/d x4) y Bu (4 mg/kg/d x4). La infusión por vía venosa central de CPSP se realizó a las 48 horas de terminar el acondicionamiento sin lavado previo y sin que se apreciase toxicidad relevante. Se administraron sistemáticamente diuréticos para evitar complicaciones por hipervolemia o por la presencia de hemoglobina libre. La cifra media de CFU-GM infundida fue de  $17,2 \pm 18,5 \times 10^4$  /kg ( $6,7 \pm 3,1 \times 10^8$  /kg CMN) para los pacientes del grupo A y de  $11,4 \pm 12,4 \times 10^4$  /kg (CMN de  $4,8 \pm 1,1 \times 10^8$  /kg) para los enfermos del grupo B. La toxicidad más frecuente asociada al acondicionamiento fue la aparición de mucositis moderada en 19 casos, dos pacientes desarrollaron EVOH, uno

de ellos con fracaso renal agudo asociado y un caso de neumonitis intersticial. Otras complicaciones durante el postransplante inmediato fueron la aparición de fiebre en 18 pacientes, nueve de los cuales con infección documentada microbiológicamente. Diez pacientes desarrollaron problemas hemorrágicos, tres de ellos graves (una hemorragia pulmonar, una hemorragia subaracnoidea, y una diátesis hemorrágica generalizada).

Todos los enfermos recuperaron más de  $0,5 \text{ PMN} \times 10^9 / \text{L}$  (mediana 15 días), comprobándose una más rápida recuperación de la neutropenia cuando la cifra de CFU-GM administrada fue superior a  $7 \times 10^4 / \text{kg}$  ( $P = 0,01$ ). La recuperación plaquetar aunque más irregular también fue generalizada ( $>50 \times 10^9 / \text{L}$  en 43 días). En tres enfermos se observaron descensos de los recuentos hemoperiféricos tras una recuperación inicial correcta. En uno de ellos se restableció la función medular tras la administración de la médula ósea previamente criopreservada, falleciendo los dos restantes sin signos de recuperación hemopoyética.

En el grupo A hasta la actualidad cinco enfermos han recidivado, siendo la mediana de duración de la remisión de 13 meses, no habiéndose alcanzado la mediana de supervivencia. Cuatro enfermos han fallecido, dos por recidiva, uno en aplasia y otro con recuperación hemoperiférica. Para este grupo la SLE fue del  $43 \pm 15\%$ . De los pacientes del grupo B, cuatro fallecieron (dos con enfermedad persistente), estando los tres enfermos restantes

vivos y en RC a los 2+, 10+ y 12+ meses.

Así pues, la recolección de CPSP movilizadas con quimioterapia permite la obtención de un número suficiente de precursores hematopoyéticos que garanticen la recuperación de la función medular tras la megaterapias de acondicionamiento en pacientes con neoplasias hematológicas. Asimismo, y a pesar de tratarse de un terapéutica de reciente instauración, los resultados preliminares sugieren fuertemente que puede ser considerada un tratamiento alternativo eficaz frente a otros tipos de autotransplante en pacientes con cáncer.

## **BIBLIOGRAFIA**

ABRAMS RA, GLANBINGER D, APPELBAUM FK, DEISSEROTH AB. Result of attempted hematopoietic reconstitution using isologous peripheral blood mononuclear cells: a case report. Blood 1980; 56:516-520.

ABRAMS RA, McCORMACK K, BOWLES C, DEISSEROTH AB. Cyclophosphamide treatment expands the circulating hematopoietic stem cell pool in dogs. J Clin Invest 1981; 67:1392-1399.

ABRAMS RA, JOHNSTON-EARLY A, KRAMER C, MINNA JD, COHEN MH, DEISSEROTH AB. Amplification of circulating granulocyte-monocyte stem cell (CFUc) numbers following chemotherapy in patients with extensive small cell carcinoma of the lung. Cancer Res 1981; 41:35-41.

ARLIN ZA, FRIED J, CLARKSON BD. Therapeutic role of cell kinetics in acute leukemia. Clinics in Hematology. 1978; 7:339-362.

ARLIN ZA, KEMPIN S, METERLSMAN R, GEE T, HIGGINS C, JHANWAR S, CHAGANTI RSK, CLARKSON S. Primary therapy of acute promyelocytic leukemia: Result of amsacrine and daunorubicin based therapy. Blood 1984; 63:211-212.

ASH RC, DETRICK RA, ZANJANI ED. Studies of human pluripotential stem cells (CFU-GEMM) in vitro. Blood 1981; 58:309-316.

BARR RD & Mc BRIDE JA. Haemopoietic engraftment with peripheral blood cells in the treatment of malignant disease. Br J Hematol 1982a; 51:181-187.

BARR RD, STEVENS CA, KOEKENBAKKER M, McBRIDE JA. Collection of erythroid progenitor cells by cytopheresis of peripheral blood of normal donors. Transfusion 1982b; 22:388-391.

BELL AJ, FIGES A, OSCIER D, HAMBLIN TJ. Peripheral blood stem cell autografting. Lancet 1986; i:1027.

BELL AJ, FIGES A, OSCIER D, HAMBLIN TJ. Peripheral blood stem cells autografts in the treatment of lymphoid malignancies: Initial experience in three patients. Br J Haematol 1987a; 66:63-68.

BELL AJ, OSCIER DG, FIGES A, HAMBLIN TJ. Use of circulating stem cells to accelerate myeloid recovery after autologous bone marrow transplantation. Br J Haematol 1987b; 67:252-253.



BELL AJ, WILLIAMSON PJ, NORTH J, WATTS EJ, STEPHNS JR.  
Circulating stem cell autografts in high-risk myeloma. Br J  
Hematol 1989; 71:162-163.

BENNET JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DAG,  
GRALNICK HR, SULTAN C. Proposals for the classification of  
the acute leukemias. Br J Hematol 1976; 33:451-458.

BERENSON RJ, ANDREWS RG, BENSINGER WI, KALAMASZ D, KNITTER  
G. Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated  
baboons. J Clin Invest 1988; 81:951-955.

BERNARD P, REIFFERS J, VEZON G, SARRAT A, MARTI G, DAVID B,  
BROUSTET A. Collection of circulating haemopoietic cells  
after chemotherapy in acute non-lymphocytic leukaemia. Br J  
Haematol 1985; 61:577-578.

BLAISE D, OLIVE D, STOPA AM, VIENS P, POURREAU M, LOPEZ M,  
PALMER P, ATTAL M, JASMIN C, MONGES G, MANAS C, MANNONI P,  
PALMER P, FRANKS C, PHILIP T, MARANINICHI D. Hematologic and  
immunologic effects of the systemic administration of  
recombinant 9interleukin-2 after autologous bone marrow  
transplantation. Blood 1990; 76:1092-1097.

BOSTROM B, MOSS TJ, DEHNER LP, RAMSAY NKC, LASKY  
LC. Autologous peripheral blood stem cell transplantation in  
solid tumors. En: Dicke K, Spitzer G, Jagannath eds.

Autologous bone marrow transplantation: Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Symposium. Austin: University of Texas, 1989.

BRADLEY TR, METCALF D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. Aust J Exp Biol Med Sci 1966; 44:287-300.

CALVO W, FLIEDNER TM, HERBST EW, HÜGL E, BRUCH C. Regeneration of blood forming organs after autologous leukocyte transfusion in lethally irradiated dogs. II. Distribution and cellularity of the marrow in irradiated and transfused animals. Blood 1976; 47:593-601.

CARTER CS, LEITMAN SF, READ EJ. Optimization of mononuclear cell collection parameters on the Fenwal CS 3000 cell separator. AM Assoc of Blood Bankers. Ann Meet, 1987.

CASTAIGNE S, CALVO F, DOUAY L, THOMAS F, BENBUNAN M, GEROTA J, DEGOS L. Successful haemopoietic reconstitution using autologous peripheral blood mononucleated cells in a patient with acute promyelocytic leukaemia. Br J Haematol 1986; 63:209-211.

CASTAIGNE S, DAL CORTIVO L, LEVERGER G, MICLEA JM, LEPAGE E, BENBUNAN M, GEROTA J, DEGOS L, BOIRON M. Autogreffes à partir des cellules souches sanguines. Nouv Rev Fr Hematol 1988; 30:69-73.

---

COBE LABORATORIES. Cobe Spectra. Separador de componentes sanguíneos. Manual del operador, 1988.

CRAIG J, PARKER AC, ANTHONY RS. The effects of various chemotherapy regimens on the levels of peripheral blood stem cell in patients with lymphoma. Bone Marrow Transplant 1990; 5 (supl 2):30-31.

DEBELAK-FEHIR KM, EPSTEIN RB. Restoration of hematopoiesis in dogs by infusion of cryopreserved autologous peripheral white cells following Busulfan-Cyclophosphamide treatment. Transplantation 1975a; 20:63-67.

DEBELAK-FEHIR K, CATCHETOURIAN R, EPSTEIN R. Hemopoietic colony units in fresh and cryopreserved peripheral blood cells of canines and man. Exp Hematol 1975b; 3:109-116.

DE LA CAMARA R, TOMAS JF, FIGUERA A, BERBERANA M, FERNANDEZ-RAÑADA JM. High dose busulfan and seizures. Bone Marrow Transplant 1991; 7:363-364.

DeWYS WD, GOLDIN A, MANTEL N. Hematopoietic recovery after large doses of cyclophosphamide: Correlation of proliferative state with sensitivity. Cancer Research 1970; 30:1692-1697.

DICKE KA, SPITZER G, PETERS L, MCCREDIE KB, ZANDER A, VERMA DS, VELLEKOOP L, HESTER J. Autologous bone marrow transplantation in relapsed adult acute leukemia. Lancet 1979; i:514-517.

DITAS SA. Haemonetics V-50-I. Sistema de aféresis. Manual de funcionamiento y mantenimiento, 1987.

DOUAY L, GORIN NC, MARY JY, LEMARIE E, LOPEZ M, NAJMAN A, STACHOWIAK J, GIARRATANA MC, BAILLOU C, SALMON C. Recovery of CFU-GM from cryopreserved marrow and in vivo evaluation after autologous bone marrow transplantation are predictive of engraftment. Exp Hematol 1986; 14:358-365.

DÜHRSEN U, VILLEVAL JL, BOYD J, KANNOURAKIS G, MORSTYN G, METCALF D. Effects of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. Blood 1988; 72:2074-2081.

EPSTEIN RB, GRAHAM TC, BUCKNER CD, BRYANT J, THOMAS ED. Allogeneic marrow engraftment by cross circulation in lethally irradiated dogs. Blood 1966; 28:692-707.

FABIAN I, DOVER D, WELLS JR CLINE MJ. Cryopreservation of the human multipotent stem-cell. Exp Hematol 1982; 10:119-122.

FAUSER AA y MESSNER HA. Granuloerithropoietic colonies in human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. Blood 1978; 52:1243-1248.

FAUSER AA y MESSNER HA. Identification of megacaryocytes, macrophages and eosinophils in colonies of human bone marrow containing granulocytes and erythroblasts. Blood 1979; 53:1023-1027.

FENWALL LABORATORIES. Separador de células sanguíneas CS-3000. Manual del operador, 1983.

FERMAND JP, LEVY Y, GEROTA J, BENBUNAN M, COSSET J, CASTAIGNE S, SELIGMANN M, BROUET JC. Treatment of aggressive multiple myeloma by high-dose chemotherapy and total body irradiation followed by blood stem cells autologous grafts. Blood 1989a; 73:20-23.

FERMAND JP, LEVY Y, GEROTA J, BENBUNAN M, COSSET J, CASTAIGNE S, SELIGMANN M, BROUET JC. Treatment of multiple myeloma by high-dose chemotherapy, total body irradiation and blood stem cell autograft. Nouv Rev Fr Hematol 1989b; 31:85-87.

FLIEDNER TM, HUGL EH, HAD HD, NOTHDURF WH, CALVO W, HUGET R, ROSS WM, SCHUDPPANF HP, STEINBACH I. Collection and use of blood stem cells in the treatment of bone marrow aplasia: a canine model. En: Leucocytes: Separation, collection and transfusion (eds. JM Goldman y KM Lowenthal) 1975; 271-275. Academy press, Londres.

FLIEDNER TM, KÖRBLING M, CALVO W, BRUCH C, HERBST E. Cryopreservation of blood mononuclear leukocytes and stem cells suspended in a large fluid volume. A preclinical model for a blood stem cell bank. Blut 1977; 35:195-202.

GALE RP, BUTTURINI A. Transplants of blood-derived hematopoietic cells. Bone Marrow Transplant 1990; 5 (supl 2):2-4.

GEISSLER K, HINTERBERGER W, LECHNER K. Increased ratio of granulocyte/macrophage progenitor cells (CFU-GM) to multilineage progenitor cells (CFU-mix) in the peripheral blood from patients with acute non-lymphoblastic leukaemia in very early remission. Br J Haematol 1986; 62:596-597.

GIANNI AM, SIENA S, BREGNI M, TARELLA C, STERN AC, PILERI A, BONADONNA G. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation. Lancet 1989a; ii:580-585.

GIANNI AM, BREGNI M, SIENA S, VILLA S, SCIORELLI GA, RAVAGNANI F, PELLEGRIS G, BONADONNA G. Rapid and complete hemopoietic reconstitution following combine transplantation of autologous blood and bone marrow cells. A hanging role for high-dose-chemo-radiotherapy?. Hematol Oncol 1989b; 7:139-148.

GILMORE MJ, PRENTICE HG, BLACKLOCK HA, MA DDF, JANOSSY G, HOFFBRAND AV. A technique for rapid isolation of bone marrow mononuclear cells using Ficoll-metrizoato and the IBM 2991 blood cell processor. Br J Haematol 1982; 50:619-626.

GOLDMAN JM, TH'NG KH, PARK OS, SPIERS A, LOWENTHAL RM, RUUTU T. Collection, cryopreservation and subsequent viability of haemopoietic stem cells intended for treatment of chronic granulocytic leukemia in blast cell transformation. Br J Haematol 1978; 40:185-195.

GOODMAN J, HODGSON F. Evidence of stem cell in the peripheral blood of mice. Blood 1962; 19:702-715.

GORIN NC. Collection, manipulation and freezing of haemopoietic stem cells. Clin Haematol 1986; 15:19-48.

GRIGG A, SHEPPERD J, PHILLIPS GL. Busulfan and phenytoin. *Ann Intern Med* 1989; 111:543-544.

HAGEMEISTER F, TANNIR N, McLAUGHLIN P, SALVADOR P, RIGGS S, VELASQUEZ W, CABANILLAS F. MIME Chemotherapy (Methyl-GAG, Ifosfamide, Methotrexate, Etoposide) as treatment for recurrent Hodgkin's disease. *J Clinical Oncol* 1987; 5:556-561.

HAINES ME, GOLDMAN JM, WORSLEY AM, McCARTHY DM, WYATT SE, DOWDING C, KEARNEY L, TH'NG KH, WAREHEAM NJ, POLLOCK A, GALVIN MC, SAMSON D, GEARY G, CATOVSKY D, GALTON D. Chemotherapy and autografting for chronic granulocytic leukemia in transformation: probable prolongation of survival for some patients. *Br J Hematol* 1984; 58:711-721.

HARE WD, LIEBERMAN RP, LUND GB, WIECZOREK BM, ARMITAGE JO, KESSINGER A. Translumbar inferior vena cava catheters: safety and efficacy in peripheral blood stem cell collection. *Transfusion* 1990; 30:511-515.

HENON PH, BECK G, DEBECKER A, EISENMANN J, LEPERS M, KANDEL G. Autograft using peripheral blood stem cells collected after high dose melphalan in high risk multiple myeloma. *Br J Hematol* 1988; 70:254-255.



HENON PH, BUTTURINI A, GALE RP. Blood-derived haematopoietic cell transplants: blood to blood?. Lancet 1991; i:961-963.

HENRIQUEZ I. Transplante autólogo de médula ósea con células mielopoyéticas de sangre periférica en tumores sólidos: descripción técnica y valoración de los 50 primeros pacientes. Tesis Doctoral. Clínica Universitaria de la Facultad de Medicina. Universidad de Navarra, Junio 1991.

HERSHKO C, HO WG, GALE RP, CLINE MJ. Cure of aplastic anaemia in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria by marrow transfusion from identical twin: failure of peripheral leukocyte transfusion to correct marrow aplasia. Lancet 1979; i:945-947.

HOELZER D, GALE RP. Acute lymphoblastic leukemia in adults: Recent progress, future directions. Semin Hematol 1987; 24: 27-39.

IACONE A, DRAGANI A, FIORITONI G, QUAGLIETTA A, D'ANTONIO D, MONTUORO A, DE ROSA L, SCIME R, MAJOLINO I, MENICHELLA G, PIERELLI L, DE LAURENZI A. Autologous blood stem cell transplantation in hematological malignancies. The italian experience. Bone Marrow Transplant 1990; 5 (supl 2):46-47.

ISCOVE N, SENN J, TILL J, Mc CULLOCH E. Colony formation by normal and leukemic human marrow cells in culture: Effect of conditioned medium from human leukocytes. Blood 1971; 37:1-5.

ISCOVE NN, SIEBER F, WINTERHALTER KH. Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow: Analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concavalin A. A J Cell Physiol 1974; 83:309-320.

JONES RJ, VOGELSANG GB, HESS AD, FARMER E, MANN R, GELLER R, PIANTADOSI S, SANTOS G. Induction of graft-versus-host disease after autologous bone marrow transplantation. Lancet 1989; i:754-757.

JUTTNER CA, TO LB, HAYLOCK DN, BRANFORD A, KIMBER RJ. Circulating autologous stem cell collected in very early remission from acute non-lymphoblastic leukaemia produce prompt but incomplete haemopoietic reconstitution after high dose melphalan or supralethal chemoradiotherapy. Br J Haematol 1985; 61:739-745.

JUTTNER CA, DYSON PG, TO LB, HAYLOCK DN, ROBERTS MM. Autologous blood stem cell transplantation in acute myeloid leukemia. Lancet 1988; i:419-420.

JUTTNER CA, TO LB, HAYLOCK DN, DYSON PG, BRADSTOCK KF, DALE BM, ENNO A, SAGE RE, SZER J, TOOGOOD IRG. Approaches to blood stem cell mobilization. Initial Australian clinical results. Bone Marrow Transplan 1990; 5(suppl 2):22-24.

KAPLAN E, MEIER P. Non parametric estimation for incomplete observations. J Am Stat Assoc 1958; 54:457-481.

KARP DD, PARKER LM, BINDER N, TANTRAVAHU R, SMITH BR, ERVIN TJ, CANELLUS GP. Treatment of the blastic transformation of chronic granulocytic leukemia using high-dose BCNU chemotherapy and cryopreserved autologous peripheral blood stem cells. Am J Hematol 1985; 18:243-249.

KESSINGER A, ARMITAGE JO, LANDMARK JD, WEISENBURGER DD. Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells. Exp Hematol 1986; 14:192-196.

KESSINGER A, ARMITAGE J, LANDMARK J, SMITH D, WEISENBURGER D. Autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation restores hematopoietic function following marrow ablative therapy. Blood 1988; 71:723-727.

KESSINGER A, ARMITAGE JO, SMITH DM, LANDMARK JD, BIERMAN PJ, WEISENBURGER DD. High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for patients with lymphoma. Blood 1989; 74:1260-1265.

KESSINGER A, BIERMAN PJ, ARMITAGE JO. Marrow metastases at the time of autologous peripheral stem cell harvesting and response of refractory Hodgkin's disease to high dose cyclophosphamide, carmustine and etoposide (CEV). J Cell Biochem 1990; 310 (suppl 14A):310.

KESSINGER A, ARMITAGE JO. The evolving role of autologous peripheral stem cell transplantation following high-dose therapy for malignancies. Blood 1991; 77:211-213.

KÖRBLING M, ROSS W, PFLIEGER H, ARNOLD R, FLIEDNER TM. Procurement of stem cells by continuous-flow centrifugation. Further comment. Blood 1977; 50:753-754 (letter).

KÖRBLING M, FLIEDNER TM, PFLIEGER H. Collection of large quantities of granulocyte/macrophage progenitor cells (CFUc) in man by means of continuous-flow leukaphereses. Scand J Haematol 1980; 24:22-28.

KÖRBLING M, DÖRKEN B, HO AD, PEZZUTO A, HUNSTEIN W, FLIEDNER T. Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with

Burkitt's lymphoma. Blood 1986; 67:529-532.

KÖRBLING M, HAAS R, KNAUF W, HOLLE R, HUNSTEIN W. Therapeutic efficacy of autologous blood stem cell transplantation (ABSCT): the role of cytotoxic/cytokine stem cell mobilization. Bone Marrow Transplant 1990a; 5 (supl 2):39-40.

KÖRBLING M, HOLLE R, HAAS R, KNAUF W, DÖRKEN B, HO AD, KUSE R, PRALLE H, FLIEDNER TM, HUNSTEIN W. Autologous blood stem-cell transplantation in patients with advanced Hodgkin's disease and prior irradiation to the pelvic site. J Clin Oncol 1990b; 8:978-985.

KÖRBLING M, FLIEDNER TM, HOLLE R, MAGRIN S, BAUMANN M, HOELDERMANN E. Autologous blood stem cell transplantation (ABSCT) versus purged bone marrow transplantation (pABMT) in standard risk AML: influence of source and cell composition of the autograft on hemopoietic reconstitution and disease-free survival. Bone Marrow Transplant 1991; 7:343-349.

KURNICK J, ROBINSON WA. Colony growth of human peripheral white blood cells in vitro. Blood 1971; 37:136-141.

---

LAPORTE JP, GORIN NC, FLEUCHTENBAUM J, LOPEZ M, DOUAY L, LYON-CAEN D, DU PUY MONTRUN MC, LEMONNIER M, ISNARD M, NAJMAN A. Relapse after autografting with peripheral blood stem cells. Lancet 1987; ii:1393.

LASKY LC, ASH R, KERSEY JH, ZANJANI E, McCULLOUGH J. Collection of pluripotent stem cells by cytopheresis. Blood 1982; 59:822-827.

LASKY LC, ZANJANI ED. Size and density characterization of human committed and multipotent hematopoietic progenitors. Exp Hematol 1985; 13:680-681.

LASKY LC, SMITH JA, McCULLOUGH J, ZANJANI E. Three-hour collection of committed and multipotent hematopoietic progenitor cells by apheresis. Transfusion 1987; 27:276-278.

LASKY LC, BOSTROM B, SMITH J, MOSS TJ, RAMSAY N. Clinical collection and use of peripheral blood stem cells in pediatric patients. Transplantation 1989a; 47:613-616.

LASKY LC, HURD D, SMITH JA, HAAKE R. Peripheral blood stem cell collection and use in Hodgkin's disease. Transfusion 1989b; 29:323-327.

---

LASKY LC. Hematopoietic reconstitution using progenitors recovered from blood. *Transfusion* 1989c; 47:552-557.

LASKY LC, KALISZEWSKI SD, DETRICK R, CHIANG KY. Treatment of peripheral blood stem cells in vitro to increased committed progenitor content. 42nd Annual Meeting of aabb. S26, 1989d.

LASKY LC, FOX SB, SMITH J, BOSTROM B. Collection and use of peripheral blood stem cells in very small children. *Bone Marrow Transplant* 1991; 7:281-284.

LAW P, DOOLEY DC, ALSOP P, SMITH DM, LANDMARK JD, MERYMAN HT. Density gradient isolation of peripheral blood mononuclear cells using a blood cell processor. *Transfusion* 1988; 28:145-150.

LINKER CA, DAMON LE, RIES CA. Busulfan /Etoposide preparative regimen for autologous purged bone marrow transplantation for treatment of acute non lymphoblastic leukemia. *Proceedings of ASCO* 1991; 10:759.

LOHRMAN HP, SCHREMI W, LANG M, BETZELER M, FLEIDNER TM, HEIMPEL H. Changes of granulopoiesis during and after adjuvant chemotherapy of breast cancer. *Br J Haematol* 1978; 40:369-381.

MANGALIK A, ROBINSON WA, DREBING C, HARTMAN D, JOSHI JH. Liquid storage of bone marrow. Exp Hematol 1979; (suppl 5) 7:76-94.

MCCARTHY DM, GOLDMAN JM. Transfusion of circulating stem cells. CRC Crit Rev Catin Lab Servi 1984; 20:1-24.

MCKREDIE K, HERSH E, FREIREICH E. Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. Science 1971; 171:293-294.

MORGAN M, DODDS A, ATKINSON K, SZER J, DOWNS K, BIGGS J. The toxicity of busulphan and cyclophosphamide as the preparative regimen for bone marrow transplantation. Br J Haematol 1991; 77:529-534.

MOTT M, GILKERSON E. Procurement of stem cells by continuous-flow centrifugation. Blood 1977; 49:156 (letter).

NOTHDURFT W, BRUCH C, FLIEDNER TM, RÜBER E. Studies on the regeneration of the CFU-C population in blood and bone marrow of lethally irradiated dogs after autologous transfusion of cryopreserved mononuclear blood cells. Scand J Haematol 1977; 19:470-481.



PHILLIPS GL, REECE DE, LERNER KG, CONNORS JM. Intensive chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation in a patient with persistent bone marrow involvement with Hodgkin's disease. Bone Marrow Transplant 1990; 6:45-47.

PIKE BL, ROBINSON WA. Human bone marrow colony growth in agar gel. J Cell Physiol 1970; 76:77-84.

PREISLER HD, RAZA A, HIFBY D, KIRSHNER J, WOLL J, BENNETT J, WINTON L, WEINER R, RICHMAN C, GOLOMB H, GOLDBERG J. Treatment of myeloid blast crisis of chronic myelogenous leukemia. Cancer Treat Reports 1984; 68:1351-1355.

RAVAGNANI F, SIENA S, BREGNI M, SCIORELLI G, GIANNI A, PELLEGRIS G. Large-scale collection of circulating haematopoietic progenitors in cancer patients treated with high-dose Cyclophosphamide and recombinant human GM-CSF. Eur J Cancer 1990; 26:562-564.

REIFFERS J, VEZON G, BERNARD P, DAVID B, CHEVALEYRE J, RICHAUD P, BOISSEAU MR, MOULINIER J, BROUSTET A. Haemopoietic stem cell autografting for chronic granulocytic leukemia in transformation. Exp Hematol 1983a; 11:148-149.

---

REIFFERS J, BERNARD P, DAVID B, BROUSTET A. Autografting for chronic myeloid leukemia in transformation. Am J Hematol 1983b; 18:105-106.

REIFFERS J, VEZON G, BERNARD P, SARRAT A, MARI G, DAVID B, BROUSET A. Collection of granulocyte-macrophage precursors in patients with acute non lymphoblastic leukemia. Plasma Ther Transfus Technol 1986; 7:93-95.

REIFFERS J, MARIT G, DAVID B, BERNARD P, BROUSTET A. Autologous blood stem cell transplantation in acute myeloid leukaemia. Lancet 1988; i:419.

REIFFERS J, MARIT G, BOIRON JM. Peripheral blood stem-cell transplantation in intensive treatment of multiple myeloma. Lancet 1989a; ii:1336.

REIFFERS J, MARIT G, BOIRON JM. Autologous stem cell transplantation in high-risk multiple myeloma. Br J Hematol 1989b; 72:296-297.

REIFFERS J, MARIT G, BOIRON JM, RICE A, BROSSARD G, FOURES C, VEZON G, BROUSTET A. Autologous blood stem cell transplantation in acute leukemia: present status and future directions. Bone marrow Transplant 1990; 5 (suppl 2):144.

REIFFERS J, TROUETTE R, MARIT G, MONTASTRUC M, FABERES C, CONY-MAKHOUL P, DAVID B, BOURDEAU MJ, BILHOU-NABERA C, LACOMBE F, FEUILLATRE-FABRE F VEZON G, BERNARD P, BROUSTET A. Autologous blood stem cell transplantation for chronic granulocytic leukemia in transformation: a report of 47 cases. Br J Hematol 1991a; 77:339-345.

REIFFERS J KÖRBLING M, LABOPIN M, GORIN NC. Autologous blood stem cell transplantation versus autologous bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission. Bone Marrow Transplant 1991b; 7 (supl 2):144.

RICH KC, RICHMAN CM, MEJIA SE, DADDONA P. Immunoreconstitution by peripheral blood leukocytes in adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency. J Clin Invest 1980, 66:389-395.

RICHMAN CM, WEINER RS, YANKEE RA. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. Blood 1976; 47:1031-1039.

RICHMAN CM, WEINER RS, YANKEE RA. Procurement of stem cells by continuous-flow centrifugation. Blood 1977; 49:157 (letter).

RICHMAN C, WEINER RS, YANKEE E. Procurement of stem cells by continuous-flow centrifugation. Further comment: Reply. Blood 1977; 50:754-755 (letter).

RODRIGUEZ-FERNANDEZ JM, CARMONA M, NOGUEROL P, PARODY R, RUIZ M, ESPIGADO I, CASO F, ELORZA MA, PARRADO A. Obtención y criopreservación de células progenitoras pluripotentes hematopoyéticas de sangre periférica. Biol Clín Hematol 1989; 11:199-205.

SCOTT I, APPELBAUM F, BUCKNER CD, PETERSEN F, FISHER LL, CLIFT R, THOMAS DE. Regimen-related toxicity in patients undergoing bone marrow transplantation. J Clin Oncol 1988; 6:1562-1568.

SIENA S, BREGNI M, BRANDO B, RAVAGNANI F, BONADONNA G, GIANNI M. Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: Enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood 1989; 74:1905-1914.

SIENA S, BREGNI M, BRANDO B, BELLI N, RAVAGNANI F, GANDOLA G, STERN AC, LASDORP P, BONADONNA G, GIANNI M. Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in

cancer patients. Blood 1991; 77:400-409.

SMITH DM, KESSINGER A, LANDMARK JD, ARMITAGE JO, WEISENBURGER DD. Recovery of peripheral blood stem cells (PBSC) and depletion of erythrocytes by elutriation or density gradient separation. Blood 1988; 72 (supl 1):408a.

SNYDER D, BLUME K, CHAO N, SCHMIDT G, AMYLON M, KONRAD P, NADEMANEE A, O'DONELL M, PARKER P, STEIN A, NILAND J, DEGAS A, FORMAN S. Fractionated total body irradiation and etoposide. An effective preparative regimen for allogeneic bone marrow transplantation for patients with leukemia in first complete remission. Proceedings of ASCO 1991; 10:740.

SOCINSKI MA, ELIAS A, SCHNIPPER L, CANNISTRA SA, ANTMAN KH, GRIFFIN JD. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. Lancet 1988; i:1194-1198.

SPITZER G, VERMA DS, FISHER R, ZANGER A, VELLEKOOP L, LITAM J, MCCREDIE K, DICKE K. The myeloid progenitor cell. Its value in predicting hematopoietic recovery after autologous bone marrow transplantation. Blood 1980; 55:317-323.

STIFF PJ, MURGO AJ, ZAROULIS CG, DeRISI MF, CLARKSON BD. Unfractionated human marrow cell cryopreservation using dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch. Cryobiology

1983a; 20:17-24.

STIFF PJ, MURGO AJ, WITTES RE, DeRISI MF, CLARKSON BD.  
Quantification of the peripheral blood colony forming  
unit-culture rise following chemotherapy: could  
leukaphereses replace bone marrow for autologous  
transplantation?. Transfusion 1983b; 23:500-503.

STIFF PJ, KOESTER AR, EAGLETON LE, HINDMAN T, BRAND E.  
Autologous stem cell transplantation using peripheral blood  
stem cells. Transplantation 1987; 44:585-588.

STORB R, GRAHAM TC, EPSTEIN RB, SALE GE. Demonstration of  
hemopoietic stem cells in the peripheral blood of baboons by  
cross circulation. Blood 1977; 50:537-542.

TAKAUE Y, WATANABE T, KAWANO Y, KOYAMA T, ABE T, SUZUE T,  
SATOH J, SHIMOKAWA T, NINOMIYA T, KOSAKA M, SHIMIZU E, OGURA  
T, KURODA Y. Isolation and storage of peripheral blood  
hematopoietic stem cells for autotransplantation into  
children with cancer. Blood 1989; 74:1245-1251.

THOMAS ED, STORB R. Technique for human marrow grafting.  
Blood 1970; 36:507-515.

TILLY H, BASTIT D, LUCET J, ESPEROU H, MONCODUIT M, FIGUET H. Haemopoietic reconstitution after autologous peripheral blood stem cell transplantation in acute leukemia. Lancet 1986; i:154-155.

TO LB, HAYLOCK DN, KIMBER RJ, JUTTNER CA. High levels of circulating haemopoietic stem cells in very early remission from acute non-lymphoblastic leukaemia and their collection and cryopreservation. Br J Haematol 1984; 58:399-410.

TO LB, DYSON PG, JUTTNER CA. Cell-dose effect in circulating stem cell autografting. Lancet 1986; i:404-405.

TO LB, JUTTNER CA. Peripheral blood stem cell autografting: A new therapeutic option for AML?. Br J Haematol 1987a; 66:285-288.

TO LB, RUSSEL J, MOORE S, JUTTNER CA. Residual leukemia can not be detected in very early remission peripheral blood stem cell collections in acute non-lymphoblastic leukemia. Leuk Res 1987b; 11:327-329.

TO LB. Assaying the CFU-GM in blood: correlation between cell dose and hemopoietic reconstitution. Bone Marrow Transplant 1990a; 5 (suppl 2):16-18.

TO LB, SHEPPERD KM, HAYLOCK DN, DYSON PG, CHARLES P, THORP DL, DALE BM, DART GW, ROBERTS MM, SAGE RE, JUTTNER CA. Single high doses of cyclophosphamide enable the collection of high numbers of hemopoietic stem cells from the peripheral blood. *Exp Hematol* 1990b; 18:442-447.

TROBAUGH F, LEWIS L. Repopulating potential of blood and marrow. *J Clin Invest* 1964; 43:1306.

VERMA DS, SPITZER G, ZANDER AR, FISHER R, MCKREDIE KB, DICKE KA. The myeloid precursor cell: a parallel study of subpopulation in human marrow and peripheral blood. *Exp Hematol* 1980; 8:32-43.

WEINER RS, RICHMAN C, YANKEE RA. Semicontinuous flow centrifugation for the pheresis of immunocompetent cells and stem cells. *Blood* 1977; 49:391-397.

WELLS JR, HO WG, GRAZE P, SULLIVAN A, GALE RP, CLINE MJ. Isolation, cryopreservation and autotransplantation of human stem cells. *Exp Hematol* 1979; (5) 7:12-20.

ZEHNBauer BA, PARDOLL DM, BURKE PJ, GRAHAM ML, VOGELSTEIN B. Immunoglobulin rearrangements in remission bone marrow specimens from patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1986; 67:835-838.