

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Factores biológicos y eficacia clínica de la fotoféresis extracorpórea en el tratamiento de la enfermedad injerto contra receptor refractaria

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Cristina Pascual Izquierdo

Directores

José Luis Díez Martín
Ismael Buño Borde
Jesús Millán Núñez-Cortés

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**FACTORES BIOLÓGICOS Y EFICACIA CLÍNICA DE LA
FOTOFÉRESIS EXTRACORPÓREA EN EL TRATAMIENTO DE LA
ENFERMEDAD INJERTO CONTRA RECEPTOR REFRACTARIA**

Doctorando:

Cristina Pascual Izquierdo

Directores: Dr. José Luis Díez Martín, Dr. Ismael Buño Borde,

Dr. Jesús Millán Nuñez-Cortés

Madrid 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**FACTORES BIOLÓGICOS Y EFICACIA CLÍNICA DE LA
FOTOFÉRESIS EXTRACORPÓREA EN EL TRATAMIENTO DE LA
ENFERMEDAD INJERTO CONTRA RECEPTOR REFRACTARIA**

Doctorando:

Cristina Pascual Izquierdo

Directores: Dr. José Luis Díez Martín, Dr. Ismael Buño Borde,

Dr. Jesús Millán Nuñez-Cortés

Departamento de Medicina

Madrid, 19 de octubre de 2015

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de forma especial a mis directores de Tesis, Dr. José Luis Díez y Dr. Ismael Buño, el estímulo continuo a la investigación. Sin ellos este proyecto no hubiera existido.

A mis compañeros, Javier Anguita, Ana Pérez Corral y Mariana Bastos, por su ayuda y apoyo constante en los momentos más duros.

A las residentes del Servicio de Hematología del HGUGM, Leyre Bento, M^a José Penalva, Laura Solán, Elena González y Sara Redondo por su ayuda en la recogida de datos.

A los TEL del laboratorio de trasplante y citometría de flujo, Carmen Falero, Gloria Ruano por su trabajo desinteresado.

A las enfermeras de la Unidad de Aféresis del HGUGM.

A todo el personal de la Unidad de Trasplante de Médula del HGUGM por su dedicación constante al cuidado del enfermo.

De forma muy especial les dedico este trabajo a mis hijos Ana, Ignacio y Juan.

A Enrique.

A mis padres.

A Honorio, donde estés.

INDICE

1. ABREVIATURAS	6
2. RESUMEN	10
3. INTRODUCCIÓN	19
3.1. Trasplante hematopoyético	21
3.1.1. Objetivos del trasplante hematopoyético.....	21
3.1.2. Fundamentos del trasplante de progenitores hematopoyéticos.....	21
3.1.3. Historia del Trasplante Hematopoyético.....	22
3.1.4. Complicaciones del Trasplante Hematopoyético.....	23
3.2. Enfermedad injerto contra receptor. Aspectos generales	23
3.2.1. Enfermedad injerto contra receptor aguda.....	26
3.2.2.1. Fisiopatología Enfermedad injerto contra receptor aguda.....	26
3.2.2.2. Factores de riesgo de la Enfermedad injerto contra receptor aguda.....	27
3.2.2.3. Epidemiología, diagnóstico y gradación de la Enfermedad injerto contra receptor aguda.....	28
3.2.2.4. Prevención enfermedad injerto contra receptor aguda.....	28
3.2.2.5. Tratamiento Enfermedad injerto contra receptor aguda	31
3.2.2. Enfermedad injerto contra receptor crónica.....	31
3.2.2.1. Fisiopatología Enfermedad injerto contra receptor crónica.....	32
3.2.2.2. Epidemiología, diagnóstico y gradación de la Enfermedad injerto contra receptor crónica.....	33
3.2.2.3. Tratamiento de la enfermedad injerto contra receptor crónica.....	34
3.3. Fotoféresis Extracorpórea	34
3.3.1. Definición de la Fotoféresis Extracorpórea.....	34
3.3.2. Historia de la Fotoféresis Extracorpórea.....	34
3.3.3. Indicaciones de la Fotoféresis Extracorpórea.....	36
3.3.4. Métodos de la Fotoféresis Extracorpórea	36
3.3.5. Mecanismo de acción de la Fotoféresis Extracorpórea.....	38
3.3.5.1. Modificaciones celulares causadas por UVA y 8-MOOP.....	39

3.3.5.2. Inducción de apoptosis.....	41
3.4.5.3. Papel de las citocinas y de las células portadoras de antígeno.....	41
3.3.5.4. Efectos de la Fotoféresis Extracorpórea sobre los linfocitos T y sobre la reconstitución inmune.....	44
3.3.5.5 Efectos adversos de la Fotoféresis Extracorpórea.....	44
3.3.5.6 Eficacia de Fotoféresis Extracorpórea en la Enfermedad injerto contra receptor aguda y crónica.....	45
3.3.5.7. Documentos consenso y esquemas de tratamiento en Fotoféresis Extracorpórea	47
4. HIPÓTESIS	51
5. OBJETIVOS.....	53
5.1. Objetivos generales.....	53
5.2. Objetivos específicos.....	53
6. PACIENTES Y METODOS.....	56
6.1. Diseño del estudio.....	56
6.2. Acondicionamiento y profilaxis de Enfermedad injerto contra receptor.....	57
6.3. Definiciones.....	58
6.4. Descripción de la intervención.....	59
6.4.1. Procedimiento de la Fotoféresis Extracorpórea	59
6.4.1.1. Colecta de CMN del paciente.....	59
6.4.1.2. Procesamiento e irradiación del producto.....	61
6.4.1.3. Reinfusión al paciente.....	62
6.5. Protocolo de tratamiento de Fotoféresis Extracorpórea.....	62
6.6. Recogida de variables analíticas.....	63
6.7. Recogida de variables dependientes de la colecta de aféresis.....	67
6.8. Recogida de variables clínicas.....	67
6.9. Análisis estadístico de los datos.....	68
7. RESULTADOS.....	70
7.1. Características de los pacientes.....	72

7.2. Análisis biológico	75
7.2.1. Valores del recuento celular pre- y post-aféresis de los pacientes en los procedimientos analizados.....	75
7.2.2. Análisis de la celularidad básica del producto infundido y características de la colecta.....	76
7.2.3. Correlación entre la celularidad pre-aféresis y la contenida en el producto.....	78
7.2.4. Eficiencia de colecta: comparación entre los dos dispositivos de colecta.....	80
7.2.5. Análisis de las subpoblaciones linfocitarias en el producto.....	82
7.2.6. Análisis de la evolución de las subpoblaciones linfocitarias en el paciente durante el tratamiento con Fotoféresis Extracorpórea.....	85
7.3. Análisis clínico	87
7.3.1. Resultados de las características clínicas de los pacientes.....	87
7.3.2. Características de la Enfermedad injerto contra receptor.....	87
7.3.3. Características de la Fotoféresis Extracorpórea.....	88
7.3.4. Variables pre-aféresis de los pacientes y de la celularidad infundida.....	90
7.3.5. Análisis de la respuesta a la Fotoféresis Extracorpórea.....	93
7.3.6. Análisis de los factores que se asocian a respuesta a la Fotoféresis Extracorpórea.....	95
7.3.7. Análisis de toxicidad durante la Fotoféresis Extracorpórea.....	98
7.3.8. Análisis de la supervivencia y muerte relacionada con el trasplante.....	100
8. DISCUSIÓN	105
9. CONCLUSIONES	118
10. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS	119
11. BIBLIOGRAFÍA	123

1. ABREVIATURAS

Listado de siglas y abreviaturas por orden de alfabético:

A

ACD-A: Acido citrato dextrosa- anticoagulante.

ADN: Acido desoxirribonucleico.

ARN: Acido ribonucleico.

ASFA: Asociación Americana de Aféresis terapéutica.

ATG: Globulina anti-timocítica.

B

BOS: Síndrome de bronquiolitis obliterante.

C

CEIC: Comité ético de investigación clínica.

CFU-GM: Unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos.

CFU-GEMM: Unidades formadoras de colonias de granulocitos-eritrocitos-macrófagos-megacariocitos.

CMNT: células mononucleadas totales.

CMH: Células madre hematopoyéticas.

CMV: citomegalovirus.

CNT: células nucleadas totales.

CPA: células presentadoras de antígeno.

CPH: Célula Progenitores Hematopoyéticas.

CSH: Célula madre Hematopoyética.

CR: Coeficiente de correlación.

CsA: Ciclosporina.

CT: Corticoesteroides.

D

DNR: Donante voluntario no relacionado.

DUE: Diplomada Universitaria en Enfermería.

E

EBMT: Grupo Europeo para el Trasplante de Médula Ósea.

EICR: Enfermedad injerto contra receptor.

EICR aguda: Enfermedad injerto contra receptor aguda.

EICR crónica: Enfermedad injerto contra receptor crónica.

ECOG: *Eastern Cooperative Oncology group*.

EMR: enfermedad mínima residual.

EMA: Agencia Europea del Medicamento.

F

FEC: Fotoféresis Extracorpórea.

FDA: *Food and Drug Administration*.

G

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos.

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos.

H

HGUGM: Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Hb: Hemoglobina.

Hct: Hematocrito.

I

IBMTR: Registro Internacional de registro de médula.

IFI: Infección fúngica invasiva.

IL: Interleucina.

IvL: injerto *versus* Leucemia.

iv: vía intravenosa.

K

KIR: receptor de las células *natural killer*.

L

LCCT: linfoma cutáneo de células T.

LMA: Leucemia Aguda Mieloide.

LLA: Leucemia Aguda Linfoblástica.

LNH: Linfoma no Hodgkin.

LT: Linfocito T.

LT-reg: Linfocito T regulador.

M

MF: mielofibrosis.

MM: mieloma múltiple.

8-MOOP: 8-metoxipsoraleno.

MO: Médula ósea.

MRT: Mortalidad relacionada con el trasplante.

mTOR: *Molecular target of rapamycin*.

N

ng: nanogramos.

NIH: *National Institute Health*.

NK: *Natural Killer*.

O

ONT: Organización Nacional de Trasplantes.

P

PH: Progenitores hematopoyéticos.

PHSP: Progenitores hematopoyéticos de la sangre periférica.

PUVA: Psoraleno ultravioleta A.

R:

RIQ: rango intercuartil.

S

SCF: factor de las células madre.

SCU: Sangre de cordón umbilical.

SMD: Síndrome Mielodisplásico.

SP: Sangre periférica.

SPL: subpoblaciones linfocitarias.

T

Th1: Linfocito *helper* 1.

Th2: Linfocito *helper* 2.

TMO: Trasplante de médula ósea.

TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

U

UTMO: Unidad de Trasplante de médula ósea.

V

vo: vía oral.

2. RESUMEN

La enfermedad injerto contra receptor aguda y crónica (EICR aguda, EICR crónica), que se produce en algunos pacientes después del trasplante hematopoyético alogénico (TPH), es una complicación que confiere una gran morbi-mortalidad. El tratamiento estándar se realiza con corticoesteroides (CT) a altas dosis, pero sólo responden un 35% de los pacientes. En los pacientes que no responden, la segunda línea de tratamiento no está bien definida y en los últimos años la Fotoféresis Extracorpórea (FEC), un tipo de terapia celular con efecto inmunomodulador, ha demostrado ser un tratamiento eficaz y seguro en esta patología en pacientes adultos y pediátricos sin efecto inmunosupresor. Las guías internacionales actuales sobre el tratamiento de la EICR recomiendan su utilización con altos grados de evidencia sobre todo en la afectación cutánea. A pesar de los grandes avances realizados en esta terapia, continuamos sin conocer múltiples aspectos relacionados con factores biológicos y clínicos, como son el mecanismo exacto de acción, la dosis de celularidad eficaz y el esquema terapéutico óptimo.

A finales del año 2009 iniciamos esta terapia a los pacientes con EICR aguda y crónica refractarios o dependientes del tratamiento con CT. El principal objetivo en este trabajo fue analizar la celularidad, en términos de células mononucleares (CMN) y de subpoblaciones linfocitarias (SPL), de los productos infundidos y su correlación con los valores de celularidad pre-aféresis de los pacientes. Adicionalmente se valoró el efecto de la FEC en la reconstitución inmune y la respuesta clínica en los pacientes estudiados.

Se realizó análisis retrospectivo de 26 tratamientos de FEC en 24 pacientes con EICR refractaria post TPH alogénico entre noviembre del 2009 y septiembre del 2014 en nuestra Unidad. Un total de 260 procedimientos de FEC fueron analizados. La media de la celularidad global obtenida en cada procedimiento fue de células nucleadas totales

(CNT) $36,5 \times 10^8$ (RIQ: 17,4- 60,6), células mononucleadas totales (CMNT) de $61,6 \times 10^6/\text{kg}$ (RIQ 18,1-86,2), las subpoblaciones linfocitarias totales CD3+CD4+ de $7,3 \times 10^8$, CD3+CD8+ de $13,1 \times 10^8$, CD19+ $3,03 \times 10^8$ y NK $3,02 \times 10^8$. La correlación entre los valores pre-aféresis y la contenida en el producto fue para linfocitos de 0,4, para monocitos de 0,6, para CD3+CD4+ de 0,8, CD3+CD8+de 0,8, CD19 de 0,9 y NK de 0,4 ($p < 0,01$ en todos los resultados). En el análisis que se realizó para comparar los dos dispositivos de colecta Cobe Spectra® y Spectra Optia®, los parámetros de eficiencia de la colecta de CMN y de pérdida plaquetaria fueron mejores en el dispositivo automático y más moderno Spectra Optia®, con muy baja contaminación de Hb, con un Hto de menos del 2%.

En el análisis de la reconstitución inmune de los pacientes al final del tratamiento con FEC se observó un aumento en todas las SPL, siendo la más marcada en la SPL CD3+CD4+. No se encontraron diferencias en la evolución de las SPL en relación a la respuesta clínica FEC.

Las respuesta global al tratamiento con FEC fue de un 58% en el grupo de EICR aguda y de un 65% en el grupo de la EICR crónica. No encontramos ningún factor biológico ni clínico predictivo de respuesta. No encontramos asociación entre la celularidad infundida en términos de CMN y SPL y la respuesta a FEC. La tasa de reducción del tratamiento con CT fue muy elevado y en los pacientes respondedores se les pudo suspender totalmente.

La supervivencia global estimada de los pacientes analizados con **EICR aguda** a los 6 meses fue del 73% (IC95%:44%-89%) desde el inicio del tratamiento con FEC. La supervivencia global de los pacientes analizados con **EICR crónica**, desde el inicio del tratamiento con FEC, a los 6 meses fue del 87% (IC95%:38%-98) Los pacientes que respondieron al tratamiento tuvieron una mayor supervivencia.

Conclusiones: la celularidad obtenida en el producto en términos de CMNT y SPL en la FEC sistema “*off-line*” fue semejante a las publicadas en la literatura con este sistema y superó el mínimo establecido como eficaz por ciclo. La correlación de la SPL entre los recuentos pre-aféresis del paciente y la contenida en el producto fue mejor que con las obtenidas en linfocitos y monocitos. Considerando que la celularidad en términos de CMN es el valor clave para la eficacia de la FEC, podríamos individualizar esta terapia conociendo los valores pre-aféresis de linfocitos, monocitos y de las SPL. El dispositivo automático y más moderno Spectra Optia® supera a la Cobe Spectra® en la eficiencia de colecta de CMN y en pérdida plaquetaria. El tratamiento con FEC en la EICR aguda y crónica permite la reducción del tratamiento con CT.

El tratamiento con FEC con el sistema “*off line*” iniciada en noviembre del 2009 en nuestra unidad es factible y aplicable a nuestros pacientes con EICR aguda y crónica refractaria.

Palabras clave: Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, enfermedad injerto contra receptor aguda, enfermedad injerto contra receptor crónica, Fotoféresis extracorpórea, células mononucleadas, subpoblaciones linfocitarias.

RESUMEN EN LENGUA INGLESA

BIOLOGICAL FACTORS AND CLINICAL EFFICACY OF EXTRACORPOREAL PHOTOPHERESIS IN THE TREATMENT OF REFRACTORY GRAFT VERSUS HOST DISEASE

BACKGROUND

Allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT) is a curative therapy for many malignant and non-malignant hematological diseases. Graft-versus-host disease (GvHD) is one of the most important complications of allogeneic HCT. It is an immune-mediated, potentially life-threatening syndrome in which host tissues are attacked by donor immune cells including T cells, natural-killer cells and macrophages. GvHD can occur in 30–50% of transplanted patients with either an HLA-identical related or an unrelated donor, and the incidence rates are substantially higher in recipients of HLA-mismatched stem cell grafts. Acute and chronic graft versus host disease (aGvHD, cGvHD), which occur in some patients after allogeneic stem cell transplantation (HSCT) is a complication that confers major morbidity and mortality.

The standard treatment of GvHD is based on high-dose steroids, but it only achieves response in 35% of the patients. At the present time, there is not a well defined second line treatment for those who do not respond. In recent years, extracorporeal photopheresis (ECP) therapy has proven to be an effective and safe treatment in this disease in both adult and pediatric patients. This therapy was approved by the FDA in 1988, after the work of Edelson *et al* demonstrating its efficacy in the treatment of cutaneous T lymphoma. In this technique, the mononuclear cells of the patient are first collected by apheresis, and after the incorporation of 8-metoxypsoralen (8-MOOP), the product is irradiated and reinfused to the patient.

There are currently two methods of performing ECP: the "on-line" system, where the entire procedure is performed without manipulation and the "off-line" open system, which is performed in three separate steps. Current international guidelines on the treatment of GVHD recommend its use with high degrees of evidence in GvHD, particularly in acute and chronic cutaneous manifestations.

Besides its considerable efficacy, ECP has an excellent safety profile, it does not cause systemic immunosuppression and therefore, does not increase either the risk of infectious complications or relapse of malignant disease.

Despite the important progress made in the field of ECP in GvHD, some questions remain unsolved, such as the optimal effective dose of mononuclear cell product, and the exact mechanism of action.

Since late 2009, we started to use this therapy in patients with aGVHD and cGVHD refractory to steroid treatment, using an "off-line" system. The main objective of this study was to analyze the cellularity of the infused product in terms of mononuclear cells (MNC) and lymphocyte subpopulations (SPL), and its correlation with the values of pre-apheresis patient cellularity. Additionally, we assessed the effect of FEC in immune reconstitution and the clinical response in the studied patients.

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

HYPOTHESIS

- The ECP, a type of immunomodulatory cell therapy is effective in the treatment of patients with acute GVHD clinical grades II to IV refractory or dependent of steroids and other conventional immunosuppressive therapy, and in the

treatment of patients with moderate to severe refractory EICR chronic or dependent on CT and conventional immunosuppressive therapy.

- The cellularity obtained in apheresis collection in terms of lymphocyte subpopulations, is related to the preapheresis cellularity of the patient, as well as to the clinical response to ECP.
- The ECP does not produce systemic immunosuppression, and therefore it does not increase the incidence of infectious complications, hematologic relapse of their underlying disease or secondary malignancies.

MAIN OBJECTIVES

Biological analysis of the content of the product:

1. Evaluation of the cellularity of the infused product, based on cell count, total nucleated cells and total mononuclear cells.
2. Evaluation of the correlation between the number of lymphocytes, monocytes and total mononuclear cells in pre-apheresis blood and in the infused product.
3. To compare the collection efficiency of total mononuclear cells from 2 apheresis devices: Cobe Spectra® versus Spectra Optia®.
4. Evaluation of the T-lymphocyte subpopulations contained in the infused product.
5. Evaluation of the correlation of T lymphocyte subpopulations in pre-apheresis blood and in the infused product. To analyze whether there are differences depending on the number of pre-apheresis leukocytes.

SECONDARY OBJECTIVES

1. To evaluate the clinical response of acute GvHD grade II-IV refractory to steroids at the end of ECP treatment with an open "off-line" system.
2. To evaluate the clinical response of moderate to severe chronic GvHD refractory to standard immunosuppressive steroids +/- refractory to steroids at the end of ECP treatment with an open "off-line" system.
3. To evaluate the impact of ECP treatment with an open "off-line" system in the required dose of steroids in acute and chronic refractory GvHD. iv
4. To correlate the clinical variables collected with the response to ECP treatment.
5. Evaluation of the relationship between the infused dose of mononuclear cells and the clinical response in patients treated with ECP open system "off-line".
6. To evaluate the toxicity of the ECP in the open system "off-line" in patients with allogeneic HSCT, in terms of infections, loss of chimerism and adverse reactions.
7. To assess whether treatment with ECP has any influence on the immune reconstitution of the treated patients.
8. Analysis of survival and transplant-related mortality.

RESULTS

Since November 2009 until September 25th 2014, a total of 260 procedures were analyzed (209 total processes were performed in the Cobe Spectra® device and 51 were performed in the Spectra Optia® device) corresponding to 26 treatments of 24 patients: 18 treatments with acute GVHD (69.2%) and 8 treatments with chronic GVHD (30.7%).

The average global cellularity obtained in each procedure was $36,5 \times 10^8$ CNT (IQR: 17,4- 60.6) $61.6 \text{ MNC} \times 10^6 / \text{kg}$ (IQR: 18.1- 86.2), total lymphocyte subpopulations CD3+CD4+ 7.3×10^8 , CD3+CD8+ $13,1 \times 10^8$ CD19 + 3.03×10^8 and NK 3.02×10^8 . The correlation between the pre-apheresis cellularity and the values contained in the product

was 0.4 to lymphocytes, monocytes to 0.6, for CD3+CD4+ 0.8, CD3+CD8+ 0.8, CD19 0,9 and NK 0.4 ($p < 0.01$ for all outcomes).

We compared two devices: the Cobe Spectra® and Spectra Optia®. The parameters of efficiency of MNC collecting and platelet loss were much better in the modern automatic device Spectra Optia®, very low contamination of hemoglobin with hematocrit of less than 2%. v

In the analysis of immune reconstitution of patients at the end of treatment with ECP, we observed the increase of all observed SPL; the most remarkable increase was noted in the CD3 + CD4 + SPL. No differences in the evolution of SPL in relation to the clinical response were found after ECP.

The overall response to treatment with ECP was 58% in the acute EICR and 65% in the group of chronic EICR. We did not find any biological or clinical factor predictive of response. We found no association between infused cellularity in terms of MNC and SPL and response to ECP. The rate of reduction treatment with CT was high and respondents reached 100%.

The estimated overall 6 months survival of the patients with acute EICR was 73% (95% CI: 44% -89%) from the start of treatment with ECP. The estimated overall 6 months survival of the patients with chronic EICR was 87% (95% CI: 38% -98) from the start of treatment with ECP. Patients who responded to ECP treatment had a higher survival.

CONCLUSIONS

1. The cellularity of the product obtained in ECP in terms of CMN and SPL can be estimated with high accuracy from the patient's blood count and from the analysis of the lymphocyte subpopulations. The count of pre-apheresis lymphocyte subpopulations estimated with higher accuracy the cellular content than the count of lymphocytes and monocytes.

2. The new device Spectra Optia® is better in collection efficiency of MNC and in platelet loss than the Cobe Spectra® device ®.
3. Despite the limitations of this retrospective study, with an heterogeneous and small cohort, where patients were included at the start of implementing a new therapy, we can conclude that the overall response to the ECP obtained in our series has been acceptable and comparable to the published literature.
4. The reduction treatment with CT was a general observation in all patients. In 100% of the patients who responded to EPC CT was withdrawn.
5. Extracorporeal photopheresis conducted through open, "*off-line*" system for the treatment of refractory EICR is a well tolerated therapy with few adverse effects and can be done properly and with quality in any apheresis unit of a tertiary hospital.

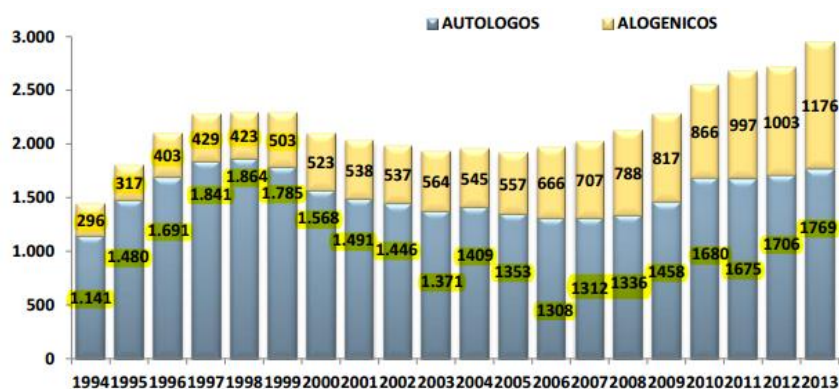
Introducción

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Trasplante hematopoyético

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) alogénico es un procedimiento terapéutico introducido en la práctica clínica desde la década de los 50, actualmente considerado como parte del tratamiento estándar de las neoplasias hematológicas y de otras patologías hematológicas no malignas de la médula ósea como la aplasia medular y algunas hemoglobinopatías.¹ La comprensión del proceso de la hematopoyesis ha sido la base para el desarrollo del mismo.² Es un procedimiento de terapia celular que permite la reconstitución de la hematopoyesis mediante la infusión de células pluripotenciales; puede dividirse en varios subtipos según el tipo de donante, la fuente de células progenitoras a infundir y el régimen de acondicionamiento empleado.³ Las primeras experiencias fueron realizadas por E. Donnall Thomas en la década de los 50⁴, que motivaron la consecución del premio Nobel de medicina en 1990. El trasplante de médula ósea (TMO) comenzó su expansión en los años 70 para experimentar un espectacular desarrollo en las décadas de los 80 y 90 siendo en la actualidad un tipo de terapia muy extendida en todo el mundo. En España, según datos de la ONT (Fig.1) en el año 2013 se realizaron un total de 2965 TPH, de los cuales 1176 fueron alogénicos y 1789 autólogos. En los últimos 5 años se ha experimentado un aumento considerable en el número de los TPH alogénicos realizados y de sus potenciales complicaciones.⁵

Figura 1. Número de TPH hematopoyéticos en España, según fuentes de la ONT 1994-2013.⁵



3.2.1. Objetivos del TPH alogénico:

Los objetivos del TPH alogénico son fundamentalmente dos¹:

1. **Sustituir la hematopoyesis** neoplásica, malfunctionante o ausente del enfermo por la del donante después de lograr la remisión de la enfermedad mediante administración previa de quimio y/o radioterapia intensiva, proceso conocido como acondicionamiento.
2. **Promover el efecto inmunomodulador de injerto contra leucemia**, considerado un efecto antitumoral beneficioso mediado por las células T del injerto que permite mantener en remisión la enfermedad de base.

3.2.2. Fundamento del TPH

En cualquiera de sus modalidades el TPH puede llevarse a cabo gracias a las características de las células progenitoras hematopoyéticas (PH) que característicamente poseen la capacidad de autoreplicación, autorenovación y diferenciación celular, entre otras, lo que les permite generar y mantener la producción de células sanguíneas.⁶ Además de los PH en el TPH se infunden otras células del donante, que facilitan el implante de los nuevos progenitores hematopoyéticos, de ellas las más importantes son los linfocitos T (LT), estos últimos son capaces de eliminar las células leucémicas residuales, el *efecto injerto contra leucemia (IvL)* y a su vez de reconocer antígenos menores de histocompatibilidad del receptor distintos de los donantes y reaccionar contra los tejidos del paciente que los expresen, mecanismo conocido como enfermedad injerto contra huésped, en la actualidad denominado enfermedad injerto contra receptor (EICR), siendo esta una de las complicaciones más importantes que ocurren después del TPH alogénico.³

En la actualidad el TPH comprende una variedad de modalidades terapéuticas al haberse ido descubriendo nuevas fuentes de obtención de las células progenitoras

hematopoyéticas. Desde hace más de 2 décadas podemos disponer de la sangre periférica y de la sangre de cordón umbilical además de la médula ósea como fuentes de PH.^{7,8} Por tal motivo, la denominación actual de Trasplante Hematopoyético es más adecuado que el de Trasplante de Médula ósea utilizado inicialmente.³

3.2.3. Historia del TPH.

Los primeros experimentos en ratones en los que se basó el TMO en humanos se efectuaron en la década de los 60, aunque a finales del siglo XIX, en el año 1892, Brown utilizó MO administrada de forma oral como tratamiento de algunas enfermedades hematológicas.⁹ Durante los siguientes años se fueron produciendo importantes avances por distintos investigadores en este campo ¹⁰⁻¹⁴ pero no es hasta finales de los 50 cuando el grupo dirigido por E. Donald Thomas⁴ en 1957, publicaron el resultado de las primeras experiencias de TMO alogénico en humanos, en las que tan sólo se consiguió un injerto temporal en uno de los pacientes. Poco tiempo después, Mathé et ál.¹⁵ publicaron su experiencia con la utilización de infusiones de médula ósea para tratar a un grupo de supervivientes de un accidente nuclear, aunque en un análisis posterior de esta serie se evidenció que los injertos conseguidos se debieron probablemente a una reconstitución hematopoyética autóloga.¹⁵ Estas experiencias pioneras precedieron al descubrimiento de los principios de la histocompatibilidad que fue el que mayor progreso que se consiguió en este campo.¹⁶ La introducción, a finales de los 60, de los estudios de compatibilidad en la selección del donante supuso un avance fundamental que, de alguna manera, inauguró la “era moderna” del TPH.^{17,18}

La presencia de una célula troncal común circulante en sangre periférica ya fue intuida por A. Maximow en 1909⁷ que postuló que el linfocito actuaba como tal célula troncal, y que migraba a través de los tejidos hasta asentarse en un microambiente adecuado. Hubo que esperar más de 50 años para que se publicaran las primeras evidencias experimentales sobre la existencia de esta célula troncal o progenitora circulante; en

1962, Goodman y Hodgson¹⁹ fueron los primeros investigadores en utilizar el término “*blood stem cell*” en la literatura científica. El grupo de E.D.Thomas confirmó posteriormente la posibilidad de aplicar estos hallazgos para el trasplante autólogo de sangre periférica en un modelo canino.²⁰ Esta fuente de células progenitoras hematopoyética (CPH) se comenzó a utilizar en pacientes en los que no se podían obtener células progenitoras medulares por su enfermedad de base o por irradiación previa, y su uso se amplió después de descubrir que los factores de crecimiento hematopoyéticos causaban una liberación transitoria de CPH en la sangre periférica (SP). De esta forma, en 1981 se introdujo la SP como fuente de CPH.²¹ La demostración de la presencia de CPH en la sangre de cordón umbilical (SCU) sugirió el uso de estas células para la realización de los TPH siendo el primer trasplante exitoso de este tipo en 1989.²² A partir de estos momentos todos los esfuerzos en la investigación del TPH han ido encaminados en disminuir la incidencia de la recidiva de la enfermedad hematológica y las complicaciones derivadas del procedimiento, aumentando la tasa de supervivencia.

3.4. Complicaciones del TPH

El TPH presenta múltiples complicaciones derivadas de la toxicidad del acondicionamiento y de la inmunosupresión al que se somete al paciente. Una de las más importantes por su alta morbi-mortalidad es la EICR, un problema que a pesar de los grandes esfuerzos realizados por los investigadores del TPH en prevenir y curarlo, en la actualidad no está resuelto.²³

3.4.1 Enfermedad Injerto contra Receptor

3.4.1.2. Aspectos generales

Alrededor de 50.000 pacientes reciben trasplantes de progenitores hematopoyéticos en el mundo cada año.²⁴ Las principales complicaciones del TPH son las infecciones, la recaída de la enfermedad primaria y en el caso del TPH alogénico, la EICR.^{24,25} Se sabe

que en pacientes que desarrollan EICR disminuye la incidencia de recidiva²⁶ y por otro lado, injertos desprovistos de linfocitos T se asocian a una menor incidencia de EICR pero a un aumento de riesgo de recidiva de la enfermedad hematológica.²⁷ Por lo tanto desarrollar una EICR leve aguda o crónica es beneficioso ya que induce un efecto inmunológico de injerto *versus* leucemia (IvL) que ayuda a la erradicación de las células malignas residuales. La clave de éxito estará en alcanzar el equilibrio entre disminución de EICR e IvL. La habilidad para predecir EICR severa permitirá a los clínicos poder establecer un tratamiento a medida sobre bases individuales para evitar el daño de órgano irreversible y mejorará la calidad de vida de los pacientes afectados. En el momento actual, se está trabajando en desarrollar y validar modelos de predicción de EICR con la determinación de biomarcadores específicos de enfermedad que nos ayudarán a prevenir y a tratar con más precisión las manifestaciones de EICR.²⁸

La EICR se produce como consecuencia del reconocimiento antigénico y posterior lesión de los tejidos y órganos del receptor por los linfocitos T maduras del donante.²⁹ En 1966, Billingham et al.³⁰ postularon las 3 condiciones necesarias para que se produzca la EICR añadiéndose la cuarta por Sackstein et al.³¹ muchos años después y son: la administración de las células inmunocompetentes, grado de histocompatibilidad entre donante-receptor, la incapacidad del receptor para destruir las células trasplantadas y la capacidad de las células del donante para alcanzar los órganos diana del receptor.

La EICR ha sido clásicamente dividida en aguda y crónica basado en el momento en que aparece y utilizando el corte a los 100 días.³² Sin embargo esta división convencional ha sido modificada por reconocer que los signos clínicos de EICR aguda y crónica³³ pueden aparecer fuera de los días establecidos. Esta observación ha llevado al aumento de la utilización de hallazgos clínicos más que del periodo de tiempo establecido para diferenciar entre EICR aguda y crónica. La clasificación NIH consenso para el diagnóstico de EICR incluye un síndrome solapado denominado “*overlap*” en el

cual características diagnósticas de EICR agudo y crónico pueden aparecer de forma simultánea.³² En la actualidad los pacientes con EICR son subclasificados basándose en el tiempo de presentación y en las características clínicas que presentan (Tabla 1).

Tabla 1. Nuevas denominaciones de la EICR aguda y crónica.³³

Categoría	Tiempo de aparición de síntomas	Características EICR aguda	Características EICR crónica
EICR aguda			
EICR aguda clásico	≤100 días	Si	No
EICR persistente recurrente, aguda de comienzo tardío.	>100 días	Si	No
EICR crónica			
EICR crónica clásico	Sin límite de tiempo	No	Si
Síndrome "Overlap"	Sin límite de tiempo	Si	Si

3.4.2 Enfermedad injerto contra receptor aguda

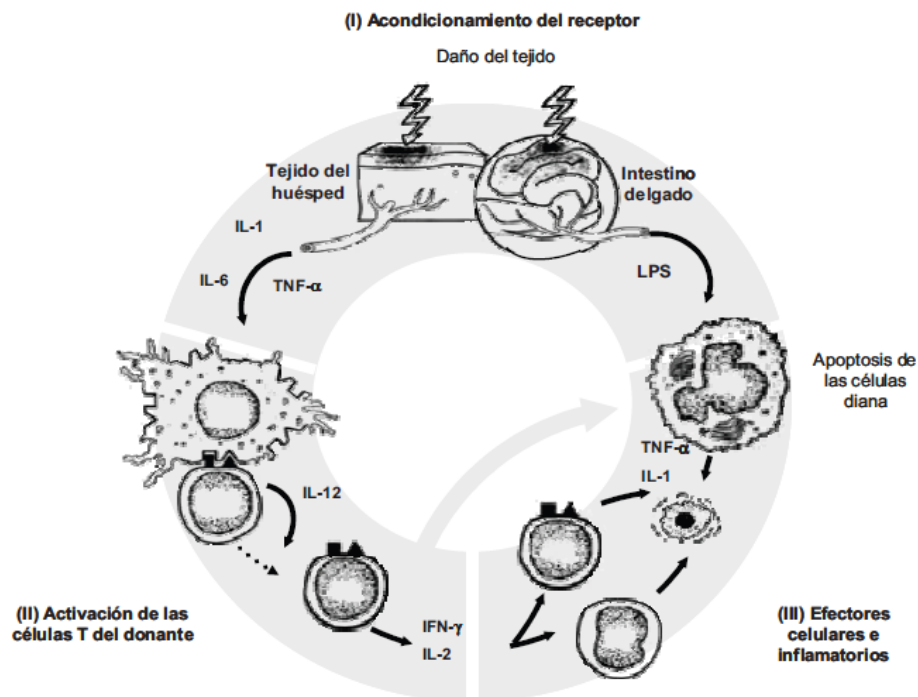
La EICR aguda representa la mayor causa de mortalidad temprana en los primeros 100 días después del TPH.

3.4.2.1. Fisiopatología de la EICR aguda

El modelo actualmente más aceptado para explicar la fisiopatología de la EICR aguda fue desarrollado por Ferrara et al.²⁴ y describió la enfermedad como un proceso en 3 fases (Fig.2). La primera comprende el daño tisular provocado por el acondicionamiento que lleva a la activación de las células presentadoras de antígeno (CPA) del huésped. La segunda comprende la activación de los linfocitos T del donante y la tercera, la

puesta en marcha de efectores celulares e inflamatorios con la liberación de citocinas y factores de necrosis tisular. La aparición de la EICR aguda es modulada en parte por la presencia de células capaces de inhibir la respuesta inmune, que son fundamentalmente los linfocitos T reguladoras (T-regs).²⁵

Fig 2. Fases de la fisiopatología del EICR aguda (Adaptada de Ferrara et al.²⁵)



3.4.2.2. Factores de riesgo para el desarrollo de la EICR aguda.

Los factores de riesgo fundamentales para el desarrollo de la EICR aguda vienen recogidos en la Tabla 2.^{34,35}

Tabla 2. Factores de riesgo para desarrollar EICR aguda

Donante	Receptor
Compatibilidad HLA (familiar/no emparentado)	Edad
Sexo (mujer/hombre)	Regímenes de acondicionamiento
Aloinmunización (partos, transfusiones)	Profilaxis de EICR
Fuente de células (sangre>médula>cordón)	Ambiente infeccioso
Alorreactividad de células NK	Predisposición genética

Se sabe que el factor de riesgo más importante para desarrollar EICR aguda es la disparidad HLA.³⁴ En un estudio reciente realizado a 2941 pacientes receptores de TPH alogénico se confirmó la importancia del grado de disparidad HLA, el uso como fuente de progenitores hematopoyéticos (PH) de donantes no relacionados y la administración de irradiación total en el acondicionamiento en predecir la incidencia de EICR moderado a severo.³⁶ Sin embargo la edad y el sexo femenino del donante no se relacionaron con la aparición de EICR aguda, aunque si se encontró relación con la EICR crónica.³⁶ Más recientemente se han descubierto otros factores no relacionados con el HLA que podrían influir en la aparición de EICR, como son polimorfismos en los genes que codifican para citocinas como los factores de necrosis tumoral, las interleucinas (IL-1, IL-6, IL10, IL21)³⁷, interfeón (INF)-gamma, el factor de crecimiento (FCT)- β y la expresión de Ag menores de histocompatibilidad de los receptores KIR³⁵ ó la dinámica del quimerismo después del TPH.³⁸ La investigación actual en EICR está centrada en encontrar un modelo de predicción de riesgo para poder prevenir y tratar de forma adaptada a cada paciente.²⁸

3.4.2.3. Epidemiología, diagnóstico y gradación de la EICR aguda

El tiempo de inicio de la EICR aguda clásica en TPH convencionales es de 2 a 3 semanas, con tiempos extremos que van de 4 días a 50 días post TPH. A pesar del tratamiento profiláctico con terapia inmunosupresora, del 20-80% de los pacientes desarrollarán EICR aguda después del TPH. Los órganos diana en la EICR aguda son la piel, el hígado y el intestino, con un amplio espectro de afectación. Establecer el grado de severidad de la EICR es fundamental para individualizar el tratamiento. La primera clasificación de severidad de la EICR aguda fue desarrollada por Glucksberg y col. en 1974³⁹, basada en el grado de afectación de cada órgano (tabla 3) y es la utilizada en la actualidad a pesar del intento de mejoras propuestas por otros autores.^{40,41}

Tabla 3. Gradación clínica de la EICR aguda (Gluskber *et al*³⁹)

Grado	Piel		Hígado		Intestino	ECOG
I	+ / ++	y	0	y	0	0
II	+ / ++ / +++	y	+	y/o	+	1
	+++ aislada			o	+ por biopsia	
III	++ / +++	y	++ / +++	y/o	++ / +++	2
IV	++ / +++ / ++++	y	++ / +++ / ++++	y/o	++ / +++ / ++++	3

3.4.2.4. Prevención EICR aguda

La EICR grado III-IV tiene un pronóstico infausto a pesar del tratamiento utilizado, por tal motivo la prevención del EICR es primordial. La razón de la profilaxis fue originalmente dirigida a provocar inmunosupresión de la función de los linfocitos T del donante con la administración pre y post-TPH de fármacos inmunosupresores. La eliminación de los linfocitos T se puede realizar con fármacos inmunosupresores o con manipulación del inóculo.¹ Los inhibidores de la calcineurina junto con metrotexate o micofenolato son las combinaciones farmacológicas más frecuentemente utilizadas en la actualidad.

Recientemente el metrotexate ha sido sustituido por el sirolimus por algunos grupos habiendo demostrado una menor tasa de EICR.⁴²

Otras combinaciones se estudiaron previamente como la sustitución de ciclosporina por el tacrolimus desde que un estudio randomizado demostró una incidencia de EICR aguda del 32% en los TPH de donante familiar y de un 58% en los TPH de donante no emparentado (DNE) en los pacientes tratados con la profilaxis de tacrolimus y metrotexate frente a un 44% y un 74% en los pacientes tratados con la profilaxis clásica sin embargo no hubo diferencias en la supervivencia por lo que no se estableció^{43,44} como manejo estándar. Actualmente se están llevando a cabo nuevos estudios randomizados fase III con el empleo de nuevos fármacos y combinaciones para la prevención de EICR, como son el micofenolato, sirolimus y la combinación de tacrolimus y sirolimus con el objetivo de mejorar la profilaxis de la EICR.⁴⁵ Otro tipo de profilaxis está basado en la eliminación de los linfocitos T del inóculo, lo que se denomina inóculo desprovisto de células T⁴⁶, previa a la infusión o *in vivo* antes y/o después de la infusión usando anticuerpos policlonales (globulina antitimocítica, ATG) o anticuerpos monoclonales. Un efecto similar puede obtenerse con la realización de selección positiva de células CD34+.^{1,47} Estas técnicas fueron ampliamente utilizadas en las décadas 80 y 90 pero se evidenció que se asociaba a una tasa alta de fallos del injerto, recaídas de la enfermedad de base e infecciones, sobre todo, por citomegalovirus (CMV). Por lo que estos métodos de prevención de EICR solo persisten en algunos grupos trasplantadores, para casos donde el riesgo de EICR es muy alto, como en el TPH haploidéntico.⁴⁸ Otros métodos de prevención de EICR actualmente utilizados son la infusión de linfocitos T-regs en el momento de la infusión de células *Stem*, mucho más recientemente el uso de Fotoféresis extracorpórea^{49,50} y la administración de altas dosis de ciclofosfamida, sobre todo, en el contexto del trasplante haploidéntico.^{45,51}

3.4.2.5. Tratamiento de la EICR aguda

La respuesta a la primera línea de tratamiento tiene una importancia capital dado que se relaciona con la supervivencia.⁵² Si solo se produce EICR cutáneo grado I, el tratamiento se realiza con esteroides tópicos. Si progresa, o el grado de afectación es de II-IV, el tratamiento inicial se realiza con CT endovenosos en altas dosis, en general, metilprednisolona 2mg/Kg/d, durante 7-14 días con una reducción gradual en los días siguientes. Dosis mayores de CT no han demostrado ninguna ventaja.⁵³ La probabilidad de respuesta decrece si el grado del EICR es más grave, pero en general entre un 40-50% de pacientes responderán. Aquellos pacientes que no respondan a los CT a dosis de 2 mg/kg/d serán candidatos a recibir una segunda línea de tratamiento. La asociación con otros inmunosupresores podría añadir alguna ventaja, como lo demostró un estudio reciente de Levine *et al*⁵⁴, que sugirieron que en el TPH de DNE, la adición de etanercept aumentaba las tasas de respuesta y de supervivencia. En el EICR intestinal el tratamiento con esteroides no absorbibles es una opción terapéutica adecuada.^{47,55}

Mientras que el tratamiento de primera línea está basado en estudios aleatorizados prospectivos, los tratamientos de segunda línea se derivan de ensayos no controlados, fase II, retrospectivos, que hacen difícil establecer una terapia estandarizada. En general, se empleará una terapia de segunda línea cuando exista progresión de los signos y síntomas de EICR tras 3-4 días de tratamiento o no haya habido cambios tras 7 días o respuesta incompleta tras 14 días de tratamiento inicial. En el momento actual, el tratamiento de elección sería incluir al paciente en un ensayo clínico si se dispone de él. En caso contrario, la elección del tratamiento de rescate se basará en los datos publicados (en su mayoría en fase I-II) y en la experiencia del grupo trasplantador. Hay varios tratamientos, ATG de conejo, anti-CD3, anti-interleucina-2, pentostatina, tratamiento con células mesenquimales⁵⁶ con resultados variables, ninguno de ellos con resultados óptimos. En nuestro centro estamos concluyendo un estudio sobre el

tratamiento de la EICR aguda y crónica refractaria a CT con células mesenquimales con aceptables resultados fundamentalmente en EICR intestinal (*datos pendientes de publicación*). La estandarización de la segunda línea de tratamiento de EICR aguda es un problema pendiente de resolver. La FEC es un tipo de terapia celular con efecto inmunomodulador, que ha demostrado ser eficaz y seguro en la EICR aguda refractaria a CT con unos resultados alentadores sobre todo en la afectación cutánea, sin producir efecto inmunosupresor, sin aumentar la incidencia de recidiva de la enfermedad de base hematológica.⁵⁷ La FEC por sus escasos efectos adversos es una terapia que en los últimos años está cobrando una amplia aceptación por los grupos trasplantadores.

3.2.2. Enfermedad injerto contra receptor crónica

La EICR crónica es la complicación tardía más frecuente del TPH alogénico. Su incidencia ha aumentado en los últimos 10-15 años debido a cambios realizados en los procedimientos de TPH que han incrementado su riesgo. La EICR crónica es una alteración inmunorregulatoria que ocurre después del TPH alogénico y comparte características de autoinmunidad e inmunodeficiencia.⁵⁸ Presenta signos y síntomas similares al Síndrome de Sjögren, esclerodermia y cirrosis biliar primaria entre otras.

3.2.2.1. Fisiopatología de la Enfermedad injerto contra receptor crónica

Al igual que en la EICR aguda, la EICR crónica es inducida por células inmunes del donante pero la fisiopatología es incluso más compleja y menos conocida. Además de la alorreactividad de los LT del donante que son tan importantes en la patogénesis de la EICR aguda, los LT CD4+ post-tímicos podrían estar implicados en su fisiopatología.⁵⁹ Los precursores de los LT pueden recibir una educación tímica aberrante que los hace autorreactivos. Adicionalmente, la activación de los diferentes subtipos de LT *helper* (Th1 vs Th2) puede ser responsable de las manifestaciones clínicas de la EICR crónica.⁶⁰ Aunque los LT son considerados la clave, datos recientes destacan la importancia de los linfocitos B en su fisiopatología.⁶¹ La EICR crónica es la principal

causa de mortalidad tardía y morbilidad después del TPH, que es causada fundamentalmente por infecciones, bien debido a la inmunodeficiencia de la EICR crónica o la provocada por el tratamiento inmunosupresor administrado.

3.2.2.2. Factores de riesgo de la EICR crónica.

El factor de riesgo mayor para la aparición de la EICR crónica es haber presentado EICR aguda previamente. Otros factores de riesgo se detallan en la tabla 4.^{36,62}

Tabla 4. Factores de riesgo para el desarrollo de la EICR crónica.

Factores Establecidos	Factores Variables
Edad avanzada del receptor	Mayor grado de <i>mismatch</i> HLA
Seropositividad de CMV del receptor	Edad avanzada del donante
Esplenectomía previa	Seropositividad CMV del donante
EICR aguda previa	Donante mujer/receptor varón
	Sangre periférica como fuente de PH

3.2.2.3. Epidemiología, diagnóstico y gradación de la EICR crónica.

La EICR crónica se presenta en el 40% de los TPH de hermano HLA idénticos y en un 70% de los HLA idénticos DNE. Un estudio reciente demostró que el comienzo de los síntomas fue más temprano con mayor grado de disparidad HLA, así la mediana de aparición de los síntomas en los TPH de donantes familiar HLA idénticos fue de 201 días y de 133 días en los TPH de DNE.⁶³ Los síntomas, en la mayoría de los casos, no comienzan más tarde de 3 años después del TPH.⁵⁸

El diagnóstico de EICR crónica está basado fundamentalmente en las manifestaciones clínicas que presenta el paciente. Los signos y síntomas pueden afectar a cualquier órgano pero los más frecuentemente afectados son la piel, uñas, boca, ojos, genitales femeninos, tracto gastrointestinal, hígado, pulmón, fascias y articulaciones. La enfermedad puede afectar a un solo órgano pero también puede tener afectación extensa de órganos y conferir una alta morbilidad. Al igual que la EICR aguda se han

establecido escalas de gravedad que ayudan a establecer el tratamiento apropiado y valorar el pronóstico (tabla 5), siendo la escala NIH la utilizada actualmente. Otras escalas han sido desarrolladas sin mejorarla.⁶⁹

Tabla 5. Valoración global de la gravedad de la EICR crónica según NIH.³²

Gradación	Descripción
Leve	1 o 2 órganos (excepto pulmón) sin repercusión funcional significativa (puntuación máxima de 1 en todos los órganos afectados)
Moderada	Al menos 1 órgano con repercusión clínica funcional pero no grave (puntuación máxima de 2), o > 3 órganos sin repercusión funcional significativa (puntuación máxima de 1 en todos los órganos afectados)
Grave	Limitación funcional grave (puntuación clínica de 3 en cualquier órgano o ≥ 2 pulmonar)

3.2.2.4. Tratamiento de la EICR crónica.

El tratamiento de la EICR crónica debe iniciarse en los pacientes con EICR moderada o grave según los criterios actualizados del NIH. Es muy importante tener en cuenta que el tratamiento inmunosupresor que iniciemos puede favorecer la aparición de infecciones y aumentar el riesgo de recidivas al limitar el efecto de injerto contra tumor asociado a la EICR crónica,^{58,64,65} por lo que siempre hay que balancear el riesgo de EICR *versus* recidiva de la enfermedad hematológica durante el tratamiento inmunosupresor.

La mayoría de los casos de EICR crónica leve responderán al tratamiento sintomático y/o tratamientos tópicos con CT u otros inmunosupresores en función del órgano afectado. En la EICR crónica moderada o grave se precisará realizar tratamiento sistémico con CT, en general, prednisona a dosis elevadas de 1 mg/kg/día con o sin ciclosporina en dosis inicial de 2.5 mg/kg/12h.⁶⁶ Si la respuesta es parcial o rebrotan los síntomas puede ser necesario utilizar una segunda línea de tratamiento. En el momento

actual no existe un tratamiento estandarizado, basado en la evidencia, de segunda línea en la EICR crónica. Disponemos de varios tratamientos con diferentes resultados, micofenolato, rapamicina, azatioprina, talidomida, rituximab, PUVA, FEC, pentostatina, imatinib, Campath, a decidir en función de las manifestaciones clínicas dominantes, del tratamiento previo y considerándolo de forma individualizada según la práctica del centro trasplantador. Si es posible se deben considerar procedimientos alternativos de tipo experimental, en ensayo clínico.¹ En general, la mediana de duración del tratamiento es de 2 años en pacientes que recibieron TPH de MO y de 3 años los que recibieron SP.¹

En conclusión, la EICR refractaria al tratamiento con esteroides es un reto clínico aún por resolver que supone un alto coste en la supervivencia y calidad de vida de los pacientes. Uno de los objetivos fundamentales en el área de investigación del TPH es el desarrollo de nuevos fármacos u otro tipo de estrategias para su prevención y tratamiento eficaces y con escasos efectos adversos. La FEC, también ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de segunda línea en los pacientes con EICR crónica, bien tolerado y sin efecto inmunosupresor.^{67,68} Esta terapia ha sido relativamente recientemente incorporada en nuestra unidad para el tratamiento de EICR agudo y crónico refractarios o dependientes de CT.

3.3. Fotoféresis Extracorpórea (FEC)

3.3.1. Definición

La FEC es un tipo de terapia celular inmunomoduladora, que comprende la colección de células mononucleares (CMN) del paciente mediante aféresis, seguido de la administración *ex vivo* de un agente fotosensibilizador 8-metoxypsoraleno (8-MOOP), irradiación posterior con rayos UVA y la reinfusión del producto al paciente.^{69,70}

3.3.2. Historia de la FEC

La Fototerapia se ha reconocido como beneficiosa desde tiempos antiguos.⁷¹ En el siglo II a.c., Z. Herodotes ya sugirió que la luz era crucial para la salud.⁷² Niels Fimsar recibió el premio Nobel en 1903 por el hallazgo de que las lesiones tuberculosas se resolvían tras la exposición a la luz ultravioleta. Los egipcios fueron los primeros en reconocer unas propiedades especiales de la planta *Ammi Maju* después de observar que los individuos que la ingerían se hacían más sensibles a las quemaduras solares, empleando estas propiedades para tratar el vitíligo en esta época. En 1948, Abdul el Mofty⁷³ de la Universidad del Cairo confirmó los hallazgos descubiertos por los antiguos egipcios y estos fueron la base para un grupo de científicos de la Escuela de Medicina de Michigan que en los años 50 les llevó descubrir el 8-MOOP y su efecto sobre el vitíligo.⁷³ En los años 70, varios grupos afirmaron que la irradiación de la piel después de la ingesta oral de 8-MOPP era efectiva en el tratamiento de la psoriasis y a este procedimiento lo denominaron PUVA (Psoraleno ultravioleta A).⁷⁴ Simultáneamente Gilcherest et al.⁷⁶ reportaron que la terapia con PUVA era efectiva en el tratamiento del linfoma T cutáneo. Fueron Edelson et al⁶⁹. en 1987 los que reconociendo los efectos beneficiosos de la radiación UVA tras la ingesta de 8-MOOP desarrollan por primera vez la FEC y comunican su eficacia en el tratamiento del linfoma T cutáneo mediante un estudio multicéntrico y que le sirvió para la aprobación de la FEC con el sistema UVAR® (Terakos, Exton, PA, USA) por la FDA en EEUU en el año 1988. Desde entonces la FEC ha llegado a ser un tratamiento establecido para el linfoma T cutáneo y la misma tecnología ha sido empleada de forma satisfactoria para tratar una variedad de patologías asociadas a desregulación inmune, como artritis reumatoide⁷⁵, esclerosis sistémica⁷⁶, lupus eritematoso sistémico⁷⁷, pénfigo vulgar⁷⁶ y más recientemente el rechazo de órgano sólido, especialmente en trasplante cardiaco⁷⁸ y pulmonar⁷⁹ y en la enfermedad injerto contra huésped post-TPH.⁸⁰ En los últimos 12 años, se han comunicado respuestas exitosas en pacientes con EICR aguda y EICR crónica en

múltiples artículos, con más o menos evidencia, que han llevado a esta terapia a convertirse en una excelente opción para este grupo de pacientes.

3.3.3. Indicaciones de FEC

En las más recientes guías de la Sociedad Americana de Aféresis (ASFA)⁸¹ varias categorías han sido definidas para la indicación de FEC (tabla 6).

Tabla 6. Indicaciones clínicas de la ASFA⁸¹ para el tratamiento con FEC.

Enfermedad	Grado de recomendación
Categoría I^a	
Linfoma T cutáneo: micosis fungoide, Síndrome de Sézary	1B fuerte recomendación con evidencia moderada
Categoría II^b	
Rechazo en trasplante cardiaco	1B fuerte recomendación con evidencia moderada
EICR crónica en piel	1C fuerte recomendación con baja calidad de evidencia
EICR aguda en piel	
Rechazo en trasplante pulmón: BOS	
Categoría III^c	
Psoriasis	2A débil recomendación con alta calidad de evidencia
Esclerodermia	
Enfermedad de Chron	2B débil recomendación con moderada calidad de evidencia
Fibrosis nefrogénica sistémica	
Pénfigo vulgar	2C débil recomendación con baja calidad de evidencia

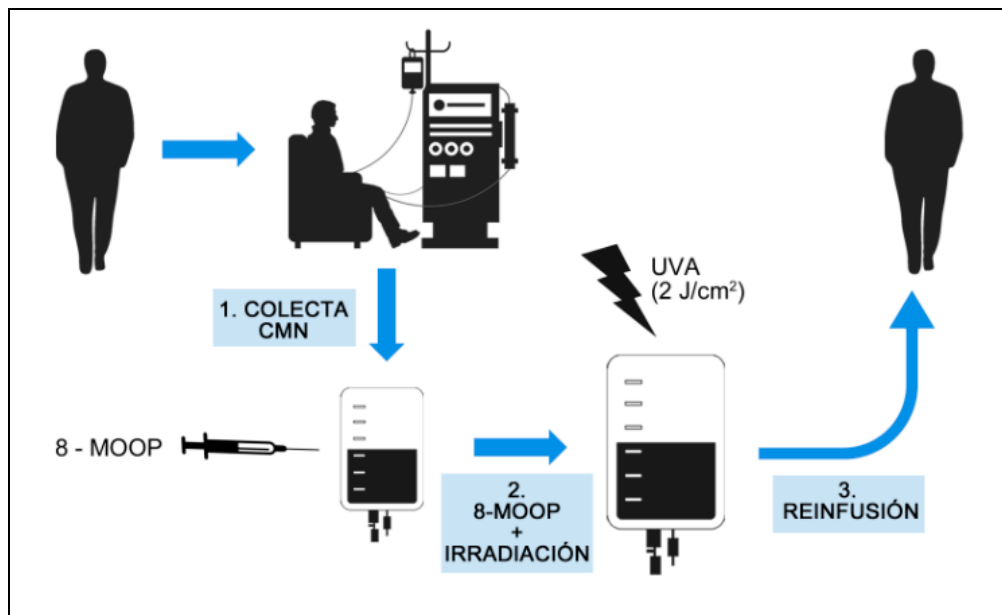
Grados de recomendación ^{1a}: Enfermedades para que la aféresis es aceptada como primera línea de tratamiento. ^{1b}: Sola o en combinación con otros tratamientos ^{1c}: Sola o en combinación con otros tratamientos ^{2a}: El papel óptimo de la aféresis no está establecido. Individualizar.

3.3.4. Métodos de FEC

En la actualidad se dispone de 2 métodos para la realización de FEC. El sistema cerrado, llamado también “*on-line*”, descrito por R. L. Edelson⁶⁹ y el sistema abierto,

llamado “*off-line*” descrito por Andreu et al.⁶ poco después. En la actualidad no hay ningún estudio randomizado que evidencie diferencias entre los 2 sistemas en cuanto a diferencias en la respuestas clínica al tratamiento con FEC. Cada centro elegirá el sistema más conveniente que se adapte a sus necesidades y posibilidades.

El procedimiento inicial de FEC descrito por Edelson, fue el sistema “*on-line*”, constituido por 4 pasos bien diferenciados⁶⁹ pero sin manipulación externa. El 8-MOOP se administraba vía oral (vo) al paciente 2 horas antes de la colecta de células mononucleares, en un 2º paso el separador de flujo continuo (UVAR®, Therakos, West Chester, PA, U.S.A.) se utilizaba para la recolección de las células mononucleares, con un hematocrito final en el producto de 4.5 (+/- 1.7%); la irradiación realizada en el mismo dispositivo comenzaba antes de finalizar la colecta de CMN y duraba alrededor de 180 minutos. Finalmente el producto era reinfundido al paciente. Esta técnica adaptada es la que actualmente se utiliza de forma generalizada en EEUU y en algunos países de Europa. Poco después de la descripción de R. L. Edelson⁴, un grupo francés dirigido por Andreu et al.⁷⁰ observaron varios inconvenientes en el procedimiento descrito: la absorción del 8-MOOP oral era variable entre pacientes, la leucaféresis utilizada no proporcionaba un *buffy coat* selecto, el hematocrito obtenido era excesivo y podría alterar el proceso de irradiación y la dosis de irradiación no era totalmente homogénea en todo el producto, por lo que ellos desarrollaron otra técnica de FEC, el llamado sistema abierto “*off-line*” (Fig.3) que consta de 3 pasos bien diferenciados, colecta de CMN, adicción de 8-MOOP al producto de colecta e irradiación UVA, y reinfusión al paciente, y que mejoraba los inconvenientes de la técnica original.

Fig 3. Pasos de la FEC con sistema "off-line".⁷⁰

3.3.5. Mecanismo de acción de la FEC

Uno de los aspectos más interesantes de la FEC y que aún no está resuelto es su mecanismo exacto de acción. El atributo más interesante atribuido a la FEC es el beneficio combinado que produce en dos enfermedades con fisiopatología muy diferente, en el linfoma T cutáneo (LCCT) y en la EICR y otras enfermedades de etiología autoinmune. Se piensa que la FEC puede ser capaz de realizar 2 efectos inmunes opuestos: un efecto inmuno-estimulador frente a células neoplásicas en el LCCT y un efecto inmunosupresor frente a las alteraciones mediadas por los Linfocitos T (LT) que se producen en la EICR.⁸²

La FEC es responsable de muchos eventos celulares siendo el más importante la inducción de la *apoptosis*. La apoptosis se produce primero en los linfocitos los cuales son más sensibles que el resto de las células. Se ha demostrado que la inyección de células apoptóticas induce tolerancia tanto en la EICR como en el rechazo de órgano en el trasplante cardiaco y de pulmón.⁸³ En estos pacientes, la fagocitosis de las células apoptóticas por las células presentadoras de antígeno (CPA) y en particular por las células dendríticas es la responsable de la transformación de la respuesta inmune Th1 a

Th2, de un aumento de las citocinas antiinflamatorias como la interleucina 10 (IL-10) y del factor de crecimiento tumoral (TGF- β), de una disminución de las citocinas proinflamatorias y finalmente de la proliferación de los linfocitos T-reguladoras. Los pasos clave y hasta el momento demostrados en el mecanismo de acción de la FEC son:⁸²

- a. Inducción de apoptosis en la mayoría de las células tratadas y en todos los subtipos de leucocitos, siendo los linfocitos activados los más sensibles a la FEC.
- b. Transformación de los monocitos, resistentes al efecto del 8-MOOP, en células dendríticas, tras activarse a través del paso por el circuito extracorpóreo y el importante papel de las estas que se comportan como células presentadoras de antígeno (CPA).

3.3.5.1. Modificaciones celulares causadas por UVA y 8-MOOP

Los psoralenos son furocumarinas inertes que cuando se exponen a la radiación ultravioleta-A se activan durante milisegundos formando enlaces covalentes entre dos bases pirimidínicas del ADN, intercalándose entre las cadenas de ADN e impidiendo su replicación y por lo tanto su síntesis.⁸⁴ (fig.4 y 5).

Figura.4. Estructuras moleculares: 8-MOOP y 8-MOOP unido a 2 bases pirimidínicas (timidina). (Adaptado de Gasparro et al. ⁸⁵)

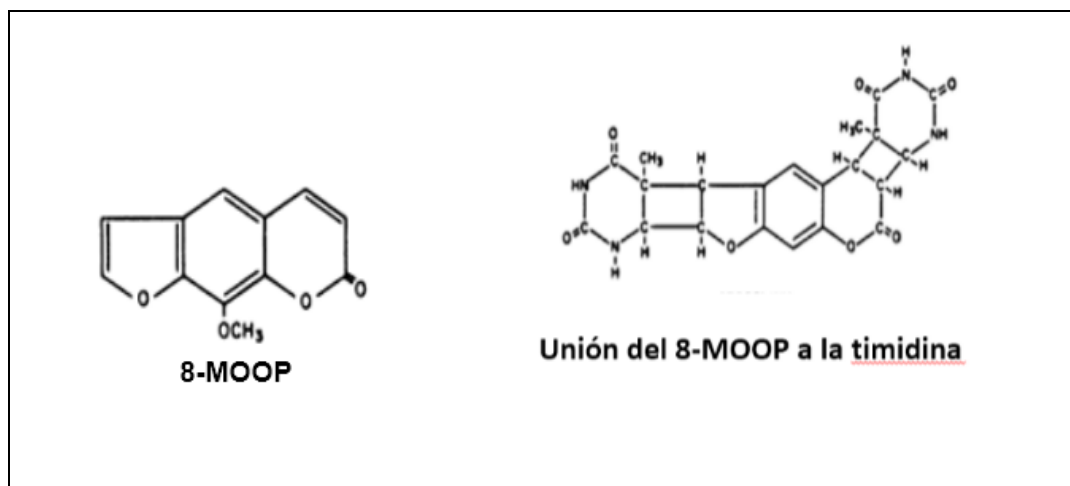
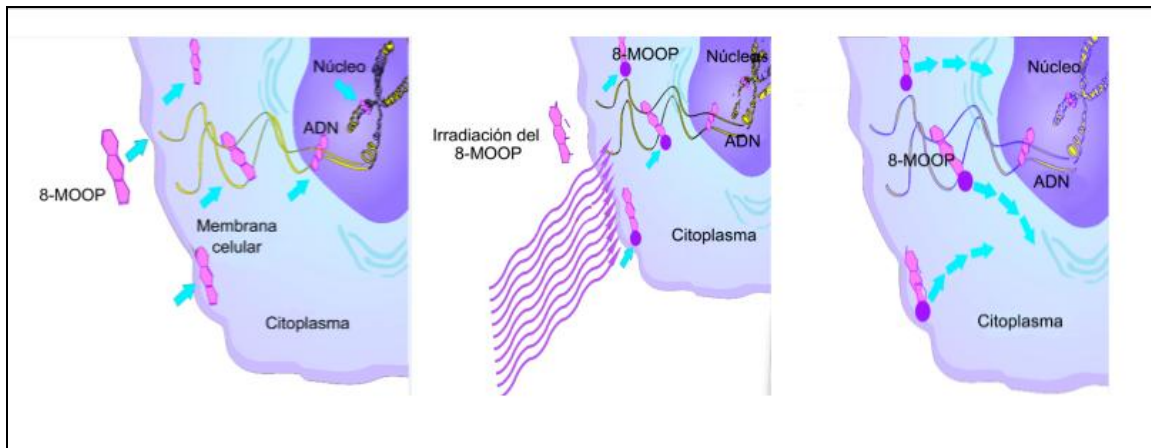


Figura 5. Modo de acción del 8-MOOP con la irradiación UVA. (Adaptado de Gasparro et al.⁸⁶)



El 8-MOOP cuando se expone a la radiación ultravioleta-A se activa formando enlaces covalentes entre dos bases pirimidínicas, intercalándose entre las cadenas de ADN e impidiendo su replicación y por lo tanto su síntesis.

Los linfocitos auto-reactivos y tumorales son más sensibles al efecto PUVA, quizá por presentar un mayor número de receptores para el 8-MOOP.⁸⁷ En la membrana celular el 8-MOOP puede modificar también otras macromoléculas, citoplasma, proteínas (albúmina, lisozima) ARN y lípidos dando lugar a otras uniones y reacciones oxidativas. La consecuencia es que el linfocito tratado es más antigénico, sufre inhibición funcional completa y muere por apoptosis 48-72 horas después.^{85,88,89} El monocito que es resistente al efecto del 8-MOOP sufre activación tras su paso por el circuito extracorpóreo transformándose en célula dendrítica.⁹⁰ Cuando se reinfunde el concentrado celular tratado al paciente, puesto que solo se tratan en cada proceso menos del 5% de los linfocitos del organismo, el efecto del tratamiento sobre el resto se ha atribuido a la autoinmunidad generada frente a los LT patológicos, lo que se ha denominado la teoría de la autovacunación.⁹⁰ Numerosos modelos experimentales han demostrado que la FEC induce una respuesta T citotóxica clono-específica contra los linfocitos T responsables de la patología autoinmune o aloinmune habiéndose objetivado que los animales tratados conservan íntegra su respuesta y su memoria inmune.⁹¹

3.3.5.2. Inducción de apoptosis

En las actuales condiciones de FEC empleando 200ng/ml de 8-MOOP y una correcta iluminación de las células con $2\text{J}/\text{cm}^2$, todas las modificaciones moleculares y celulares relacionadas con la FEC neutralizan la proliferación celular y provoca apoptosis de la mayoría de las células irradiadas. Inmediatamente después de la FEC, las células están intactas y vivas y conservan su capacidad para estimular linfocitos en la reacción mixta linfocitaria. La apoptosis aparece en los linfocitos varias horas después de la FEC y el pico es a los 3 días. Las células T alorreactivas son continuamente activadas por su ambiente en el rechazo de órgano y en la EICR. Durante la respuesta inmune en la EICR, el rechazo de órgano y en las enfermedades autoinmunes los clones expandidos son dominantes y probablemente más sensibles a la acción de la iluminación por UVA en presencia de 8-MOOP. Esto podría explicar el por qué la FEC no afecta a otras respuestas inmunes y causa una supresión selectiva de la respuesta celular inmune dominante.^{92,93}

3.3.5.3. Papel de las citocinas y de las células presentadoras de antígeno (CPA)

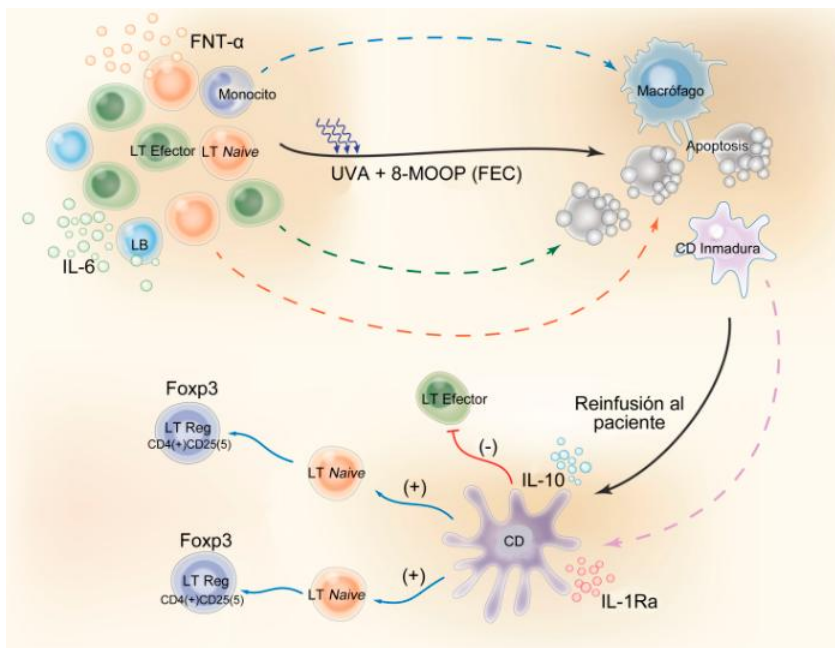
Las células dendríticas son células especializadas en ser presentadoras de antígeno y son capaces de controlar la inmunidad, desencadenando respuestas inmunes o manteniendo la tolerancia.⁹⁴ Se piensa que la apoptosis inducida por la FEC estimula la diferenciación de monocitos a células dendríticas inmaduras que pueden llegar a ser CPA activas y productores de citocinas.⁹⁵ Se ha demostrado que después de la FEC se produce un incremento en la producción de factor de necrosis tumoral (TNF)- α e interleucina 6 (IL-6) en los pacientes con LCCT⁹³ y un aumento de las citocinas inmunosupresoras IL-10 y IL-1Ra en pacientes con EICR.⁹⁶

Un proceso similar ocurre como resultado de la apoptosis linfocitaria inducida por la FEC. Cuando los linfocitos tratados son reinfundidos, las CPA reconocen los marcadores de apoptosis de la superficie celular y modifican su función. Las CPA, que

han fagocitado células T apoptóticas, presentan los antígenos a los linfocitos T en los ganglios linfáticos y bazo lo cual resulta en la generación de LT-regs. Como la mayoría de las células T en el producto de FEC proceden de los clones predominantes en la sangre periférica, esta ejerce un efecto supresor para las respuestas inmunes celulares, en los casos de la EICR. Los modelos murinos proveen de más evidencia en la implicación de los LT-regs en la inmunosupresión inducida por la FEC en el rechazo de órganos en el trasplante cardiaco⁹⁷ como en la EICR.⁹⁸ Estos experimentos sugirieron que la FEC revertía la EICR a través de la reducción de los LT efectores del donante y al aumento de la generación de LT-regs. Apoyando estos experimentos en modelos animales, Biagi et al.⁹⁹ demostraron que los LT-regs estaban aumentados en pacientes con EICR que reciben FEC. Su estudio demostró una correlación en el tiempo entre el tratamiento con FEC y el aumento de los linfocitos T-regs circulantes, aunque sugirieron que se necesitarían más estudios para poder confirmar sus hallazgos y poder determinar el papel de los linfocitos T-regs en mediar el efecto clínico de la FEC.

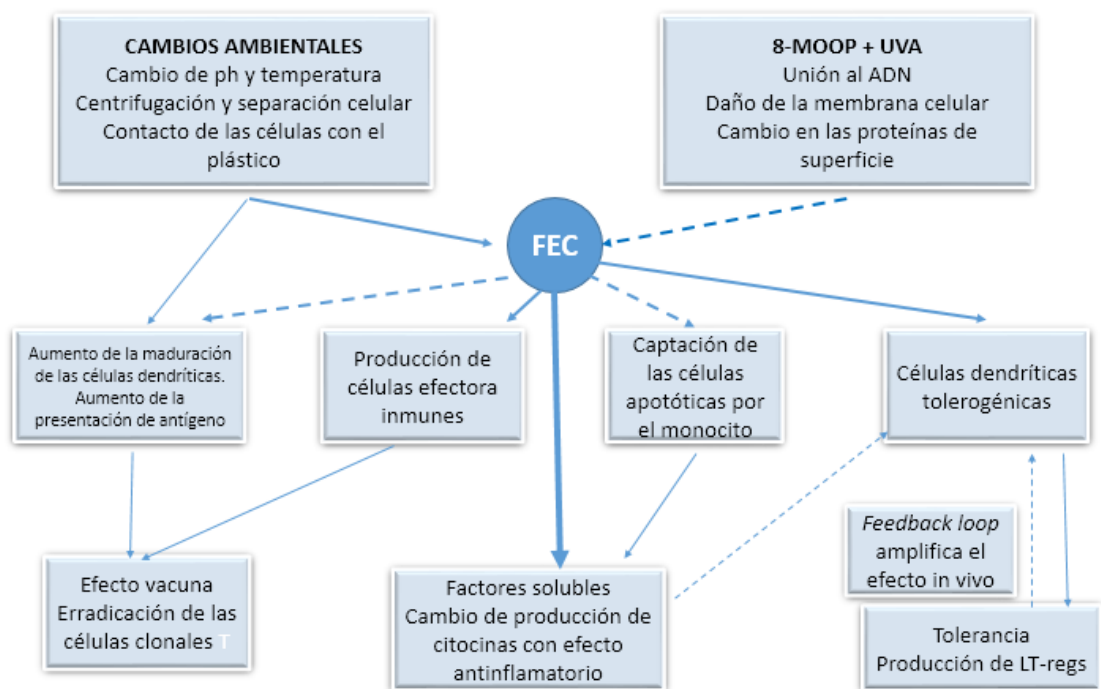
En resumen, los pasos clave para que la FEC reduzca la respuesta immune mediada por LT en pacientes con EICR son (fig.6 y 7): (1) Apoptosis de los Linfocitos, (2) Fagocitosis de los linfocitos apoptóticos por las CPA, (3) Un cambio en la actividad de las CPA a favor de las citocinas antiinflamatorias, (4) una disminución de actividad de la citocinas proinflamatorias y (5) un aumento de Linfocitos T-regs.

Figura 6: Modelo de mecanismo de acción de la FEC en EICR. (Adaptado de Hart et al.⁹⁹)



(1) La apoptosis de los linfocitos por UVA+MOOP. (2) Fagocitosis de estos linfocitos apoptóticos por células dendríticas (CDs). (3) CDs secretan cantidades significativas de anti-citoquinas inflamatorias (IL-10 y IL-1ra). (4) CD generan Tregs inmunosupresores específicas de antígeno en lugar de activar los linfocitos T (*T-naïve*) a linfocitos T efectoras (T-efectoras). FEC: fotoféresis extracorpórea, CPAs, células presentadoras de antígeno; IL, interleucina; células dendríticas; 8-MOOP, 8 metoxipsoraleno; UVA, Radiación ultravioleta A.

Figura 7: Propuesta de mecanismo de acción de la FEC, (Adaptado de Marshal et al.¹⁰⁰)



3.3.5.4. Efectos de la FEC sobre los linfocitos T y sobre la reconstitución inmune.

Aunque repetidos procesos de FEC pueden producir linfopenia leve, ésta no juega un papel importante en las modificaciones inmunológicas inducidas por la FEC ni aumento de la inmunosupresión del paciente tratado.¹⁰¹ Inicialmente se observó que en pacientes tratados a largo plazo con FEC en linfoma cutáneo T no hubo aparición de neoplasias ni aumento de riesgo de infecciones. Además la sensibilidad retardada y la respuesta a la tricofitina y candidina fueron normales en pacientes tratados con FEC.^{102,103} Todos los estudios realizados han apoyado la idea de que este tratamiento no ocasiona inmunosupresión en los pacientes, siendo esta una de las mejores ventajas de este tratamiento. Otro aspecto muy importante es el efecto producido por el tratamiento con FEC en los pacientes con EICR sobre la reconstitución inmune. El cambio más importante producido es una normalización de la “*ratio*” CD4+/CD8+ que además podría relacionarse con la respuesta clínica a la FEC.^{104,105} En los pacientes con EICR que responden a la FEC se ha objetivado un aumento del número de linfocitos CD4+, fundamentalmente los LT-regs sin producirse inmunosupresión,¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ siendo esta una de las grandes ventajas del tratamiento con FEC

3.3.5.5. Efectos adversos de la FEC

Los efectos adversos derivados de la FEC son escasos y en general bien tolerados. Varios artículos han comunicado el perfil de seguridad de este procedimiento y la incidencia de efectos adversos es de menos de 0,003%. Inicialmente se describieron efectos adversos al 8-MOOP oral. Los potenciales efectos tóxicos del 8-MOOP están ligados a sus propiedades fotosensibilizantes las cuales incluyen el daño directo del ADN y la producción de especies reactivas de oxígeno. La aparición de fotosensibilidad, fatiga, prurito y fiebre han sido comunicados como efectos secundarios raros de la FEC. La aparición de afaquia se comunicó de aparición excepcional.¹⁰⁹ Por el contrario cuando se utiliza 8-MOOP que se mezcla ex-vivo con el *buffy coat*, la vida media de

este se acorta y es muy bien tolerado. En el momento actual se han tratado pacientes con FEC, sistema “*on-line*” y “*off-line*”, que ascienden a más de 500.000 tratamientos, se ha definido como una terapia segura.¹¹⁰ Otros efectos adversos comunes son cefalea, náusea, fiebre, hipotensión transitoria que pueden ocurrir durante la colecta de CMN. La aparición de parestesias relacionadas con el citrato es frecuente y se controla con la administración de calcio endovenoso u oral. Las infecciones del catéter son otra complicación potencial y que puede presentarse por manipulación continua del catéter, Anemia o trombocitopenia pueden aparecer en tratamientos prolongados.^{97,111–114} La mayoría de los pacientes pueden ser tratados con FEC y las únicas contraindicaciones¹¹⁵ para el tratamiento con FEC son que el paciente no pueda tolerar volumen extracorpóreo (insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal, hipotensión, sepsis) o que presente alteraciones de la coagulación. Si existiera diarrea importante de más de 1 litro/día se debería valorar riesgo de desestabilización.¹¹⁵ Adicionalmente la utilización del 8-MOOP está contraindicado en pacientes con reacciones idiosincrásicas, historia de fotosensibilidad o que presenten afaquia. Pacientes con anemia o trombocitopenia severa no deben excluirse y se administrará las transfusiones con hemoderivados irradiados cuando la Hb sea menor de 8gr/L y el recuento de plaquetas menor de $20 \times 10^9/L$. El procedimiento de FEC debería retrasarse en presencia de una infección severa y cuando el recuento de leucocitos sea menor de $1 \times 10^9/L$, aunque no hay evidencia de un recuento mínimo de células mononucleares para un procedimiento eficiente.¹¹⁵

3.3.5.6. Eficacia en la EICR aguda y crónica en pacientes adultos.

Owsianowski et al.¹¹⁶ reportaron el primer tratamiento exitoso de un paciente con EICR refractaria con FEC en 1994 y desde entonces han sido numerosos los estudios publicados en este campo. El grupo de Viena dirigido por H. Greinix¹¹⁷ demostró en un estudio en fase II que la efectividad de la FEC en EICR aguda y que las respuestas mantenidas estaban asociadas a un aumento de la supervivencia lo que alentó a la

comunidad trasplantadora a la utilización de esta terapia y que más tarde publicó con un mayor número de pacientes.¹¹⁸

Llevamos más de 20 años de experiencia de tratamiento con FEC de la EICR y con probada eficacia pero con la excepción de un estudio randomizado controlado¹¹², los datos comunicados evaluando la eficacia de la FEC son limitados a estudios no aleatorizados de una sola institución, datos retrospectivos, o series pequeñas de casos. Una vez más, los meta-análisis han sido útiles en esta patología para poder evaluar la eficacia de FEC en la EICR aguda y crónica.¹¹⁹⁻¹²¹ En el comunicado por Abudale et al¹¹⁹, se realizó una revisión sistemática para evaluar la totalidad de la evidencia en relación a la eficacia de la FEC en el tratamiento de la EICR aguda y EICR crónica refractaria o dependiente de esteroides. Nueve estudios, incluido un ensayo controlado aleatorio, cumplieron los criterios de inclusión, con un total de 323 sujetos. En análisis combinados, las tasas de respuesta global fueron del 69% (IC 34-95%) y del 64% (IC, 47-79%) para la EICR aguda y crónica, respectivamente. En las respuestas de órganos específicos en la EICR aguda, la FEC dio lugar a la más alta tasa de respuesta para la afectación cutánea, con 84% (IC 95% 75-92), seguido de la gastrointestinal con un 65% de ORR (IC 52%-78%). Se observaron tasas de respuesta similares se observaron en la EICR crónica con afectación de piel y del tracto gastrointestinal. Por el contrario, la "Odds ratio" para EICR crónica que afecta los pulmones fue muy pobre con una tasa de respuesta del 15% (IC del 95%, 0-0,5). En la EICR crónica, se produjo una tasa muy baja de eventos adversos en 0,38% (IC 95%, 0,06-0,78). Las tasas de mortalidad relacionadas con la FEC fueron extremadamente bajas. Las tasas de interrupción de la inmunosupresión fueron de 55% (IC 40-70%) y de 23% (IC del 95%, 7%-44%) para la EICR aguda y crónica, respectivamente. Hautmann et al.¹²², recientemente publicaron un estudio retrospectivo, en el que analizaron los resultados del tratamiento con FEC en 30 pacientes con EICR aguda y 32 con EICR crónica con el *sistema abierto "off line"*. Encuentran que la FEC está asociada a tasas globales de respuesta clínica aceptables,

un 50% en la EICR aguda y un 42%, pero el hallazgo más destacado vuelve a ser la reducción significativa del tratamiento con CT en pacientes con EICR, con una tasa mayor de supervivencia en los respondedores.¹²² dato que ha sido comunicado por otros autores.

En resumen, aunque el número de estudios disponibles prospectivos aleatorizados es limitado, los análisis combinados de los estudios prospectivos demuestran respuestas alentadoras después del tratamiento FEC en la EICR aguda^{80,117,123} y crónica^{113,124} en pacientes refractarios al tratamiento con CT y sobre todo en la reducción del tratamiento con CT sin aumentar el grado de inmunosupresión y sin aumento de la recidiva de la enfermedad hematológica.^{123,125} Un aspecto que no se ha podido demostrar hasta el momento es la relación entre la celularidad infundida y la respuesta al tratamiento con FEC.^{126,127}

3.3.5.7. Documentos consenso de guías de actuación en FEC y esquemas de tratamiento.

Cuando no hay una fuerte evidencia que soporte un procedimiento, los métodos consenso permiten recomendaciones que nos ayudan en gran medida a tomar decisiones en un entorno multidisciplinar. En la actualidad hay 2 documentos consenso sobre guías de actuación del tratamiento con FEC para la EICR aguda y crónica. Recientemente se han publicado dos interesantes documentos consenso que nos han ayudado a consensuar varios aspectos de la FEC en para el tratamiento de la EICR.^{115,128}

Hay varios esquemas de tratamiento y ninguno ha probado ser mejor que otro. En general el más utilizado para EICR aguda y crónica es de dos sesiones por semana hasta conseguir máxima respuesta, seguido de un descenso de sesiones gradual adaptado a cada paciente dependiendo de su respuesta clínica, que se evaluará periódicamente. La FEC se suspende si no hay respuesta ó esta es mínima. En la

actualidad la mayoría de los centros sigue el siguientes esquema: 2 procedimientos cada semana durante 4 semanas, luego 2 procedimientos cada 2 semanas durante 2 meses y luego dos procedimientos cada mes durante 6 meses o más, hasta que el paciente se estabilice. Heshmati¹²⁹ propuso dos a tres procedimientos dependiendo de la severidad del EICR durante 4 semanas o más, En la EICR crónica el esquema de tratamiento consiste en 2 sesiones por semana hasta que haya respuesta clínica.¹³⁰ En general no hay acuerdo sobre cuál es la duración óptima del tratamiento con FEC, aunque algunos se puedan beneficiar de tratamientos más duraderos de 12-24 meses, sobre todo los que tengan respuesta parcial o los pacientes que experimenten recaídas al suspenderlo.

Recientemente se están comunicando otros tipo de esquemas de tratamiento de FEC procesando volemias mayores en cada procedimiento y así disminuir el número de procedimientos a 1 por semana¹³¹ y la propuesta de estudio dentro del Grupo Español de Trasplante Hematopoyético (GETH), de un nuevo esquema de tratamiento con FEC que tras 4 ciclos de 2 procesos por semana, se pasa a un proceso semanal. Otras alternativas son el empleo de minifotoféresis¹³², la criopreservación del producto.¹³³ Las mas recientes novedades comunicadas en el último Congreso Europeo de Trasplante EBMT 2015 en FEC han sido sobre la eficacia de la FEC en prevenir EICR utilizándola en el pretrasplante¹³⁴ en un modelo animal y en su utilización en el tratamiento de EICR refractaria en primera línea post-trasplante.⁵⁰ En la actualidad varios estudios están en marcha con la intención de valorar la eficacia de FEC en estas situaciones.¹⁰⁸

Otro aspecto importante son los costes derivadas de su utilización. En un estudio español, se demostró un coste-efectividad positivo derivado del uso de FEC frente a otros tratamientos inmunosupresores o antifibróticos en pacientes con EICR crónica.¹³⁵

Aunque la FEC se lleva utilizando mucho tiempo y sabemos que funciona, hay varios aspectos en el campo de la FEC, concretamente en el sistema “*off line*” que quedan por resolver o por conocer con más exactitud. Entre ellos se encuentran:

1. Aspectos biológicos:

No se conoce con exactitud la celularidad media en términos de CMNT mínima contenida en el producto para considerar efectiva la FEC, si existe correlación entre la celularidad, fundamentalmente de linfocitos y monocitos del paciente pre-aféresis y el contenido en el producto pre-infusión. No se conoce con precisión si existen dispositivos de aféresis con mejor rendimiento de colectas de CMN. No se conoce con precisión el contenido de las SPL en el producto pre-infusión y si existe correlación con las que existentes en el paciente pre-aféresis, se desconoce el rendimiento medio de las subpoblaciones linfocitarias en el proceso de la colecta de CMN. No está establecido el recuento leucocitario mínimo para iniciar la FEC ($> 1 \times 10^9/L$) ó de linfocitos mayor de $0,2 \times 10^9/L$. No se conoce con detalle el efecto sobre la reconstitución inmune en el paciente tratado con FEC.

2. Aspectos clínicos

No se conoce con exactitud si la celularidad infundida tanto en términos de CMNT y de SPL se relacionan con la respuesta clínica a la FEC y desconocemos el esquema de tratamiento óptimo.

En conclusión la prevención y el tratamiento de la EICR aguda y la EICR crónica es un campo en continua evolución. La FEC, sistema *on-line* y *off-line*, es una terapia que está siendo adoptada cada vez en más centros de TPH españoles con buenas experiencias. Se hace necesario ampliar el conocimiento y poner en común los protocolos de tratamiento utilizados y aunar experiencia con el objeto de mejorar los resultados clínicos.

Hipótesis

4. HIPÓTESIS

La FEC es un tipo de terapia celular inmunomoduladora es efectiva en el tratamiento de pacientes con EICR aguda grados clínicos II a IV refractaria o dependiente de CT y otros tratamientos inmunosupresores habituales, y en pacientes con EICR crónica moderada-grave refractaria o dependiente de CT e inmunosupresores convencionales.

- La celularidad obtenida en la colecta de CMN en la FEC, en términos de CMNT, con el sistema “*off line*” es un aspecto muy importante para que la FEC sea efectiva y se correlaciona con los recuentos hematológicos que tiene el paciente pre-aféresis.
- La celularidad obtenida en la colecta de aféresis en términos de subpoblaciones linfocitarias influye en la respuesta clínica a la FEC en los pacientes tratados y se correlaciona con las existentes en el paciente pre-aféresis.
- La FEC no produce inmunosupresión sistémica por lo que no aumenta la incidencia de complicaciones infecciosas ni induce al aumento de recidivas de su enfermedad hematológica de base ni la aparición de segundas neoplasias.

Objetivos

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVOS GENERALES

1. Evaluar la celularidad del producto infundido en los procesos realizados en términos de CMNT y su correlación con las existentes en el paciente pre-aféresis.
2. Evaluar la celularidad del producto infundido en los procesos realizados en términos de subpoblaciones linfocitarias y su correlación con las existentes en el paciente pre-aféresis.
3. Evaluar la respuesta clínica a la FEC en los pacientes con EICR aguda y crónica refractarios a CT.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Análisis biológico del contenido del producto.

1. Comparar los recuentos celulares pre-aféresis y post-aféresis de los pacientes.
2. Analizar la celularidad, en términos de células nucleadas totales, células mononucleadas totales, y de subpoblaciones linfocitarias T contenida en el producto infundido y en el paciente pre-aféresis.
3. Evaluar la correlación entre el número de linfocitos y monocitos, células mononucleadas totales y de las subpoblaciones linfocitarias T contenidas en el producto infundido y las existentes en el paciente pre-aféresis.
4. Comparar la eficacia en la colección de células mononucleares totales entre 2 dispositivos de colecta de aféresis diferentes, Cobe Spectra® versus Spectra Optia®.

Análisis de la respuesta clínica.

1. Evaluar la respuesta clínica de la EICR aguda grados clínicos II-IV refractaria a CT al final del tratamiento a la FEC en sistema abierto “*off-line*”.

2. Evaluar la respuesta clínica de la EICR crónica moderada-grave refractaria a CT refractaria a esteroides al final de tratamiento a la FEC en sistema abierto “*off-line*”.
3. Evaluar la disminución en las dosis de esteroides al final de tratamiento con FEC en sistema abierto “*off-line*” en la EICR aguda y crónica refractaria a CT.
4. Analizar si existe alguna variable clínica que influya en la respuesta al tratamiento con FEC
5. Analizar si la celularidad infundida en términos de CMNT y SPL influye en la respuesta clínica a la FEC.
6. Evaluar la toxicidad de la FEC en el sistema abierto “*off-line*” en pacientes con TPH alogénico, en términos de infecciones, pérdida del quimerismo y reacciones adversas.
7. Evaluar si el tratamiento con FEC tiene alguna influencia sobre la reconstitución inmune de los pacientes tratados.
8. Analizar la supervivencia y mortalidad por EICR en los pacientes tratados con FEC.

Pacientes y Métodos

6. PACIENTES Y MÉTODOS

6.1 Diseño del estudio.

Se trata de un estudio unicéntrico observacional retrospectivo, iniciado en noviembre del 2009 y finalizado en septiembre del 2014 (última fecha de recogida de datos el 25 de septiembre), en el que se incluyeron consecutivamente a los pacientes mayores de 16 años a los que se les realizó un TPH alogénico en nuestro centro y fueron tratados con FEC sistema “*off-line*”, con un mínimo de 2 procedimientos, considerados necesarios para análisis biológico. La información de los pacientes: datos demográficos, número de historia, datos clínicos, tratamiento inmunosupresor, se obtuvo de los registros clínicos informáticos incluidos en la Documentación Clínica del HGUGM.

Se analizaron todos los pacientes que fueron tratados con FEC en el periodo descrito y que desarrollaron:

- a. EICR aguda grados II a IV (Según GVHD *Grading Consensus Conference*, *Przepiorka et al*⁴⁰,1995), refractarios o dependientes de esteroides y que se indicó iniciar tratamiento con FEC en sistema abierto “*off-line*”.
- b. EICR crónica moderada-grave (según criterios del NIH 2005³²), refractarios o dependientes de esteroides e inmunosupresores habituales o bien con toxicidad por los esteroides u otros tratamientos, que vayan a iniciar tratamiento con FEC en sistema abierto “*off-line*”.

Se incluyeron 24 pacientes, y se analizaron 26 tratamientos (2 de los pacientes recibieron FEC en dos ocasiones diferentes y en distintas fases de la EICR). 13 tratamientos en pacientes con EICR agudo, 3 EICR aguda persistente, 2 EICR “*overlap*” y 8 pacientes con EICR crónica. Los pacientes con EICR “*overlap*” se analizaron en el grupo de EICR agudo.

El análisis de la EICR y de la respuesta clínica al tratamiento con FEC se realizó finalmente en 17 tratamientos del grupo de EICR aguda y en los 8 tratamientos de la EICR crónica. 1 paciente solo recibió 2 procedimientos y no se incluyó en el análisis de la respuesta clínica ni en el de supervivencia.

Se obtuvo aprobación por el CEIC local del HGUGM y el consentimiento informado de cada paciente antes del procedimiento.

6.2. Acondicionamiento y profilaxis de EICR.

Los regímenes de acondicionamiento y profilaxis de EICR utilizados fueron los establecidos en protocolo en la Unidad de Trasplante de Médula del HGUGM que están adaptados a cada tipo de TPH, concretamente:

En el **TPH de donante familiar HLA idéntico** el acondicionamiento se realiza con Fludarabina iv, 40 mg/m²/día (días -6, -5, -4 y -3) y Busulfán iv, 3.2 mg/kg/día (días -6, -5, -4 y -3). La profilaxis de la EICR se realiza con Ciclosporina A, dosis de 5 mg/kg/12h iv desde día -1 hasta tolerancia oral y posteriormente se pasa a vo ajustando la dosis a niveles en sangre de 175-225 ng/ml hasta día +50 y con Metotrexate iv a dosis de 15 mg/m² día +1 y 10 mg/m² días +3, +6 y +11.

En el **TPH de DNE HLA idéntico** el acondicionamiento se realiza con Fludarabina iv 40 mg/m²/día (días -6, -5, -4 y -3) y Busulfán iv 3.2 mg/kg/día (días -6, -5, -4 y -3).

La profilaxis de EICR se realiza actualmente con Ciclofosfamida 50 mg/kg iv x 2 días (+3 y +4). Ciclosporina A 1.5 mg/kg/12h iv desde día +5 hasta tolerancia oral, posteriormente pasar a vo y Mofetil Micofenolato 10 mg/kg/8h iv desde el día +5 hasta tolerancia oral, posteriormente 10 mg/kg/8h vo hasta el día +35, que se retirará en ausencia de EICR aguda.

En el **TPH Haploidéntico (Mini y Maxi-Haplo TPH)** de MO/SP (Protocolo Hopkins) el acondicionamiento es en el Mini-TPHi: Fludarabina iv 30 mg/m²/día (días -6 a -2), Ciclofosfamida 14.5 mg/kg iv (días -6 y -5), Busulfán iv 3.2 mg/kg (día -3). En pacientes

con alto riesgo de recaída, considerar repetir dosis de Busulfán iv el día -2 y el en Maxi-TPH: Fludarabina 40 mg/m²/día (días -6 a -3) y Busulfán iv 3.2 mg/kg (días -6 a -3), Ciclofosfamida 14.5 mg/kg (días -6 y -5).

La profilaxis de la EICR se realiza con Ciclofosfamida 50 mg/kg iv durante 2 días (+3 y +4). Ciclosporina A 1.5 mg/kg/12h iv desde día +5 hasta tolerancia oral, posteriormente pasar a vo y Mofetil Micofenolato 10 mg/kg/8h iv desde el día +5 hasta tolerancia oral, posteriormente 10 mg/kg/8h vo hasta +35, que se retirará en ausencia de EICR aguda.

En el **TPH del SCU dual** el acondicionamiento se realiza con Fludarabina iv 30 mg/m² (días -8 a -5), Busulfán 3.2 mg/kg (días -6 y -5) y Ciclofosfamida iv 60 mg/kg (días -4 y -3), suero antitimocito de conejo (Timoglobulina[®]) 2 mg/kg (días -8 y -7).

La profilaxis de la EICR se realiza con Ciclosporina A: 1,5 mg/kg/12h IV desde día -5 hasta tolerancia oral, posteriormente pasar a vo hasta día +50. Desde día +50, en ausencia de EICR, reducción de la dosis (5% semanal) hasta suspender y Metilprednisolona: 2 mg/kg/día IV desde día -8 hasta el día -7 (ambos inclusive), posteriormente se descenderá a 1 mg/kg/día desde día -6 hasta el día +7 y descenso paulatino hasta la suspensión en 10 días.

El tratamiento inmunosupresor se aplicó a los pacientes con EICR diagnosticada según práctica clínica de acuerdo a los protocolos de tratamiento de EICR-UTMO (HGUGM) Jacie-2012 basados en las guías *consenso* nacionales e internacionales, ya descrito en los apartados 3.4.2.5 y 3.5.1.3.

6.3. Definiciones:

La indicación de FEC fue clasificada *en corticoide dependiente o corticoide refractaria*. *Esteroides dependientes* son aquellos pacientes que mostraron respuesta a esteroides pero reaparecieron los síntomas al iniciar el descenso, y *esteroides refractarios*, a los que presentaron falta de respuesta después de al menos 7 días de tratamiento con CT,

metilprednisolona, a dosis de 2mg/kg/d o de 2 meses en la EICR crónica los que no presentaron ninguna mejoría de los síntomas con el tratamiento con esteroides.

Definición de la respuesta a FEC: En el EICR agudo la respuesta fue evaluada después de 4 semanas y al final de tratamiento. En el EICR crónico la respuesta fue evaluada después de las primeras 4 semanas y al final del tratamiento. En los casos donde el tratamiento duró más de 3 meses, también se analizó la respuesta en este punto.

Se definió **respuesta completa** (RC) como la resolución completa de todos los síntomas o signos de EICR sin iniciar un nuevo tratamiento inmunosupresor o con suspensión total del tratamiento con esteroides durante la FEC.

Se definió **respuesta parcial** (RP) como la mejora del más del 50% de las manifestaciones de EICR manifestadas al inicio de FEC.

Se definió como **no respuesta** (NR), cuando no hubo mejoría de los signos y síntomas de EICR o cuando hubo que añadir tratamiento inmunosupresor adicional.

Para el análisis estadístico los pacientes fueron divididos en 2 grupos, respondedores y no respondedores. Respondedores incluyeron los 3 primeros puntos: RC y RP, y los no respondedores, lo ya definido.

6.4. Descripción de la intervención:

6.4.1. Procedimiento de FEC.

Todos los procedimientos de FEC se realizaron en la Unidad de Aféresis del Servicio de Hematología del HGUGM. Los pacientes podían estar ingresados o ambulantes.

El sistema de FEC utilizado fue el sistema “*off-line*” realizado en 3 pasos:

1. Colecta de CMN del paciente:

- Para la colecta fue necesaria una vía central de doble luz y de calibre no menor de 13 que en el 100% de los pacientes fue un catéter tipo Hickman® de doble luz implantado en el servicio de Radiología Vascular del HGUGM. En la mayoría de los casos se implantó antes de iniciar el TPH.
- En los pacientes que cuando se indicó el inicio de FEC no portaban un catéter venoso central implantado, se programó su colocación antes de iniciarla si fue posible. Si no fue posible, se inició vía periférica y se programó la colocación del catéter central.

El dispositivo que se utilizó para la colecta de células mononucleares fue el separador celular Cobe Spectra (Terumo BCT®, Lakewood, CO, USA (Fig 9): programa de CMN (linfocitoaféresis). Desde junio del 2014, también se utilizó el separador Spectra Optia (Terumo BCT®, Lakewood, CO, USA® automático (Figura 8), incorporado en nuestra Unidad.

Figura 8. Dispositivos de colecta de MNC: Cobe Spectra® y Spectra Optia®, BCT-Terumo .



La volemia estimada fue calculada por el dispositivo de acuerdo a los datos de peso de cada paciente. En todos los pacientes se procesaron entre 1.5-2 volemias. El anticoagulante utilizado en la colecta de MNC fue en todos los procedimientos ACD

(ácido-citrato-dextrosa) con un volumen inicial de 500 ml con un ratio variable entre 1:12 a 1:14 dependiendo de las características del paciente, recuento de plaquetas previo al inicio del tratamiento. En el programa realizado el hematocrito final del producto fue de menos de 2%.

Durante todo el procedimiento se tomaron constantes vitales (antes de iniciar, a la mitad y al finalizar, y siempre que se precisara): Tensión arterial, frecuencia cardiaca. En el caso de producirse efectos secundarios derivados del ACD, se administró Gluconato Cálcico vo o iv, dependiendo de la intensidad de los síntomas. Se registraron todos los datos referentes a la colecta y todos los efectos adversos en cada procedimiento.

2. Procesamiento del producto e irradiación:

El producto recolectado se traspasó a una bolsa especial permeable a la luz UVA (MacoPharma®, Tourcoing, Francia). Se completó el producto obtenido hasta 300 ml con suero fisiológico 0.9% y se le añadieron 3 ml de 8-MOOP, Metoxisalene 0,1mg/5ml (S.A.L.F.®, Cenate Sotto, Italy) para una obtener una concentración final del fármaco de 200 ng/ml. Todo este procedimiento fue realizado en la sala limpia incorporada en nuestra Unidad de Aféresis. Posteriormente se realizó la irradiación del producto en un irradiador externo (MACOGENIC- G1 Vilber, Lourmat, Marnela-Vallee (Macogenic G1, Macopharma®), Francia; La dosis empleada fue en todos los procesos de 2 julios/cm² con la bolsa colocada horizontalmente y en movimiento continuo durante 8-10 minutos.

Este paso se llevó a cabo en el Servicio de Hematología del Hospital Niño Jesús de Madrid desde el inicio de esta terapia en nuestra Unidad en noviembre del 2009 hasta febrero del 2014. En enero del 2014 incorporamos el irradiador Macogenic, UVAMATIC-Macopharma® en nuestro servicio y desde entonces todo el proceso se realizó en nuestra unidad.

3. Reinfusión al paciente:

El producto obtenido se reinfundió a todos los pacientes en el mismo día mediante un sistema sin filtro en un tiempo aproximado de 1 hora (según el peso del paciente: 10ml/Kg/h) en el Hospital de Día de Hematología. Con el objeto de evitar posibles reacciones alérgicas, previo a la reinfusión se administraron de acetaminofén 500 mg vo o iv y clorfeniramina 6 mg iv.

Se monitorizaron y recogieron los efectos adversos y cualquier eventualidad durante todo el procedimiento en los impresos habilitados para las infusiones de terapia celular en nuestra Unidad (*Jacie-2012*).

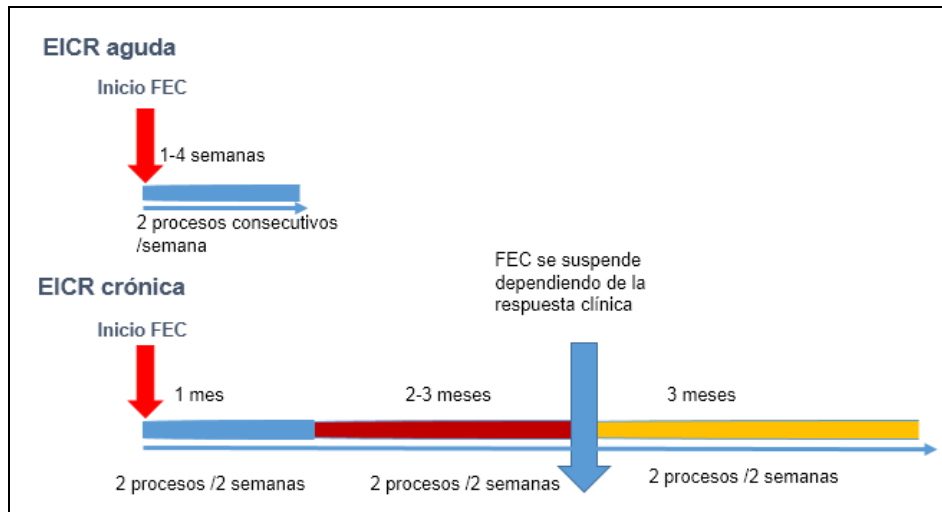
6.5. Protocolo de tratamiento con FEC

En el Comité que realizamos semanalmente donde nos reunimos todo el equipo de facultativos y DUEs que intervenimos en el TPH se consensuó que pacientes iniciarían el tratamiento con FEC. Se programó el esquema de tratamiento y los días de la semana en que se realizarían.

En los pacientes diagnosticados de EICR agudo se inició 1 ciclo semanal (2 procesos en días consecutivos) durante las primeras 4 semanas (Fig.9). Posteriormente se prosiguió con 1 ciclo semanal cada 15 días según respuesta clínica. En los pacientes que tras 4 semanas no se obtuvo una respuesta completa se continuó con 1 ciclo semanal hasta conseguir respuesta completa. El objetivo principal fue la suspensión completa del tratamiento con corticoides.

En pacientes con EICR crónico se inició 1 ciclo (2 procesos en días consecutivos) cada 15 días hasta respuesta (Figura 9). Posteriormente se continuó con 1 ciclo al mes hasta respuesta completa. En los casos severos se realizaron 1 ciclo por semana durante 4 semanas y posteriormente se pasó a 1 ciclo cada 15 días hasta respuesta clínica, luego 1 ciclo cada mes hasta suspensión del tratamiento con CT.

Figura 9. Protocolo de tratamiento FEC realizado en nuestra unidad



Previo a cada procedimiento se realizó un hemograma. En el caso de que el recuento de plaquetas fue menor de $20 \times 10^9/L$ se transfundió un pool de plaquetas irradiadas y si la Hb fue menor de 8 gr/L se transfundió una unidad de hematíes irradiados. El número de leucocitos no fue criterio para no iniciar el tratamiento con FEC.

6.6. Suspensión del tratamiento con FEC.

La decisión de suspender el tratamiento con FEC fue realizado individualizando cada caso, teniendo en cuenta la respuesta clínica incluyendo cambios en el tratamiento inmunosupresor, razones logísticas y la decisión de tratamiento de los Facultativos responsables del paciente. En general, el tratamiento con FEC se suspende cuando la respuesta es estable tras 2 ciclos, cuando no hay respuesta después de 4 semanas de tratamiento en la EICR aguda y tras 3 meses de tratamiento en la EICR crónica y cuando se produzca progresión del EICR o recidiva de la enfermedad hematológica o infección activa.

6.6.1. Recogida de variables analíticas.

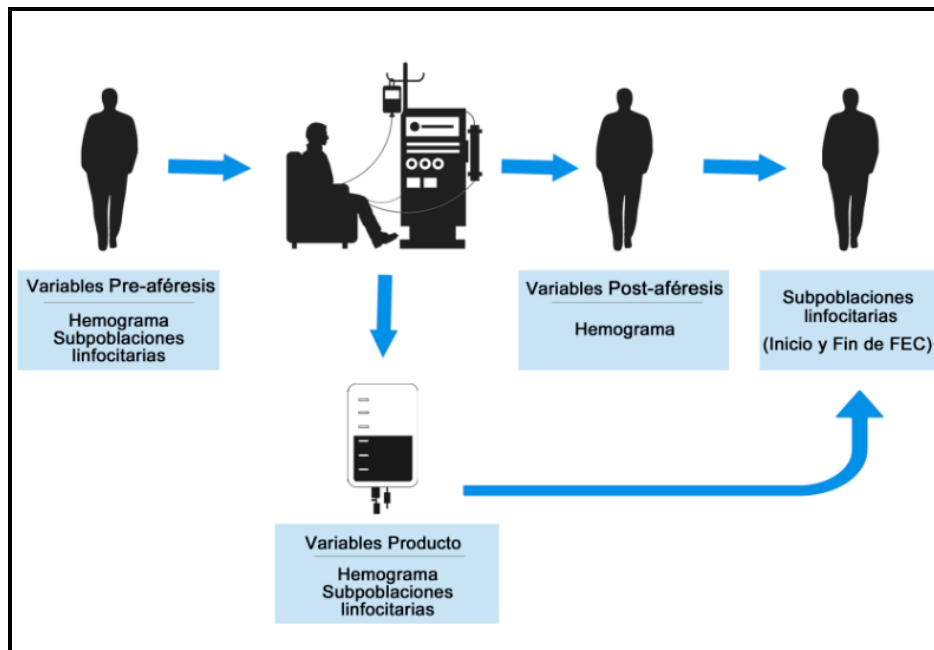
Previo y al finalizar a cada procedimiento de FEC se tomó una muestra sangre periférica al paciente y al producto en un tubo de EDTA para la realización de un hemograma en el contador automático Unicell DHX 800 (Beckman Coulter®) y LH750

(Beckman Coulter®) y determinar el recuento de leucocitos, linfocitos, monocitos, hemoglobina, hematocrito y plaquetas (figura 10).

Se determinaron en análisis de las subpoblaciones linfocitarias pre-aféresis al paciente en el 1º día de cada ciclo de FEC y en todos los productos colectados antes de reinfundir el producto (figura 10).

En el laboratorio de citometría de flujo se realizó el análisis de las subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo multiparamétrica de 4 y 5 colores con tecnología Beckman® Coulter en citómetros FC500® y Navios® Beckman Coulter International S.A. En ambos citómetros se utilizaron en este análisis los fluorocromos FITC (Isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), ECD (ficoeritrina-Texas red), PC5 (ficoeritrina-cianina 5), PC7B (ficoeritrina-cianina 7). Para el marcaje linfocitario se utilizaron anticuerpos monoclonales conjugados de marca registrada Beckman® Coulter en que estos fluorocromos se combinaron con los siguientes anticuerpos: CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD56+.

Figura 10. Esquema de recogida de muestras para el estudio.



Inicialmente se realizó un análisis de la celularidad global de todos los procedimientos y en un segundo paso analizamos la celularidad de la colecta teniendo en cuenta el dispositivo de aféresis utilizado. Todo el análisis biológico se realizó en la cohorte global de pacientes, independiente del paciente y del tipo de EICR.

En todos los pacientes se determinó el quimerismo en médula ósea, sangre periférica y linfocitos T antes y un mes después de finalizar el tratamiento con FEC.

El análisis de quimerismo se realizó por PCR en tándem (STR-PCR). El ADN genómico total se purificó a partir de muestras de BM y PB usando Maxwell® kit de Purificación de ADN 16 Blood (Promega®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los lisados celulares se obtuvieron a partir de linajes celulares purificados por incubación durante la noche a 56°C con proteinasa K (100 mg / ml) se usaron directamente para STR-PCR. La PCR se realizó con 2 ng de ADN genómico utilizando kit AmpFISTR SGM Plus® (Life Technologies), que contiene 10 loci STR para gen amelogenina XY etiquetada en 3 colores diferentes (azul, 5'FAM; verde, JOE, amarillo, NED). Productos de PCR amplificados fueron sometidos a análisis de fragmentos por electroforesis capilar en un 3130xl Genetic Analyzer® (Life Technologies) en las condiciones recomendadas por el

fabricante. Finalmente el quimerismo se cuantificó con el software Genemapper 4,0 (Life Technologies), usando el área bajo los picos en píxeles de los alelos al diagnóstico para estimar las cantidades relativas de ADN donante y el receptor.

Con el objeto de valorar la eficiencia de la colecta se calcularon los siguientes parámetros (tabla 7).

Tabla 7. Fórmulas de los parámetros de colecta.

Parámetro	Fórmula
Rendimiento medio de las subpoblaciones linfocitarias (%)	$\frac{\text{CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+, NK+ en el producto}}{\text{CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+, NK+ sangre periférica pre-aféresis}} \times 10^9 / \text{L} \times \text{volumen procesado (ml)} \times 100$
Coefficiente de eficiencia de Células Nucleares Totales (CNT %)	$\frac{\text{Leucocitos bolsa} \times 10^6 \times \text{volumen}}{\text{leucos pre} \times (\text{volumen procesado} - \text{anticoagulante})} \times 100$
Coefficiente de Células Mononucleares Totales (CMNT %)	$\frac{[\text{CMN bolsa} \times 10^6 \times \text{volumen bolsa} / \text{CMN pre} \times (\text{volumen procesado} - \text{cantidad de anticoagulante})]}{\text{anticoagulante}} \times 100$
Pérdida plaquetaria %	$\frac{[\text{Recuento plaquetas pre-aféresis} - \text{recuento plaquetas post-aféresis} / \text{recuento pre-aféresis}] \times 100}{100}$

6.6.2. Recogida de variables dependientes de la colecta de aféresis:

Se registraron los parámetros referentes a cada proceso obtenido de los registros obtenidos del dispositivo de aféresis: volemia del paciente, volumen procesado, volumen final de la bolsa, tiempo de colecta, cantidad de anticoagulante utilizado en el paciente y cantidad de anticoagulante empelado en la bolsa con el producto final.

Con el objeto de analizar si la celularidad infundida estaba relacionada con la respuesta clínica a la FEC determinamos la media de las CNT, CNT/kg, CMNT, CMNT/kg infundida y la dosis de cada subpoblación linfocitaria infundida de todos los procedimientos en cada paciente y proceso.

Se realizó un estudio de los dos dispositivos Cobe Spectra® vs Spectra Optia® en una cohorte de 9 pacientes del grupo total.

6.6.3. Recogida de las variables clínicas.

Se recogieron todos los datos clínicos procedentes de la documentación clínica del gestor de pacientes del HGUGM: edad, sexo, peso, enfermedad hematológica, tratamiento previo al TPH, situación de la enfermedad antes del TPH, tipo de TPH, fuente de PH, tipo de donante, tipo de acondicionamiento, profilaxis de EICR, celularidad CD34+ infundida, líneas de tratamiento inmunosupresor previo a FEC, línea en que se utilizó FEC, indicación de FEC, nº de procesos, duración en días, reducción de tratamiento con CT al final del tratamiento.

Las variables clínicas analizadas fueron:

- Respuesta clínica de la FEC en EICR agudo y crónico.
- Ratio de respuesta global a la FEC en la EICR agudo y EICR crónica.
- Influencia de la celularidad infundida en términos de CNT y CMNT y SPL en la respuesta clínica en la EICR aguda y EICR crónica.

- Correlación de los leucocitos, linfocitos, monocitos, y plaquetas del paciente previo a la ECP y la respuesta clínica.
- Respuesta al tratamiento FEC en base a: edad, sexo, tipo de TPH, tipo de acondicionamiento, líneas de tratamiento previo a TPH, tipo de EICR, grado de EICR, y celularidad infundida.
- Supervivencia global en los respondedores/no respondedores a FEC en el grupo de la EICR aguda y la EICR crónica.
- Mortalidad relacionada con EICR e incidencia acumulada de muerte por EICR en los respondedores y los no respondedores, utilizando como evento competitivo muerte por recidiva de la neoplasia hematológica.

6.7. Análisis estadístico de los datos

Los resultados de las variables continuas se presentaron mediante su media y desviación típica. Para las variables categóricas, los resultados se mostraron en frecuencias y porcentajes. Aquellas variables numéricas con distribución no normal, los resultados se expresaron mediante su mediana y rango intercuartílico (RIQ: percentil 25 - percentil 75). El análisis de normalidad se estudió con la prueba de *Kolmogorov-Smirnov*.

Para estudiar la diferencia de medias entre 2 o más grupos se utilizaron la prueba U de *Mann-Witney* y la prueba t de *Student* aplicando la más adecuada en cada caso en función de la normalidad de los datos y del número total de pacientes de cada grupo.

La asociación a la respuesta clínica a el tratamiento con FEC entre variables cualitativas, se estudió mediante la prueba χ^2 de *Pearson* o exacta de *Fisher*.

La asociación a la respuesta clínica al tratamiento con FEC entre variables cuantitativas se analizó con el coeficiente de correlación lineal de *Pearson* y el coeficiente de correlación no paramétrico de *Spearman*.

Para estudiar la mortalidad global y por grupos desde el inicio del tratamiento con FEC, se realizaron curvas de supervivencia *Kaplan-Meier* utilizando la prueba *log-rank* para la comparación de los distintos grupos. Para estudiar la muerte por EICR, se hicieron curvas de incidencia acumulada, siendo la muerte por recidiva el evento competitivo.

El análisis estadístico se realizó con el programa IBM SPSS *Statistics for Windows*, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp. Se consideraron como estadísticamente significativos aquellos resultados con una $p < 0,05$.

Resultados

Resultados

7.1. Características de los pacientes.

7.2. Análisis biológico.

7.2.1. Valores del recuento celular pre- y post-aféresis de los pacientes en los procedimientos analizados.

7.2.2. Análisis de la celularidad básica del producto infundido y características de la colecta.

7.2.3. Correlación entre la celularidad pre-aféresis y la contenida en el producto.

7.2.4. Eficiencia de colecta: comparación entre los dos dispositivos de colecta.

7.2.5. Análisis de las subpoblaciones linfocitarias en el producto.

7.2.6. Análisis de la evolución de las subpoblaciones linfocitarias en el paciente durante el tratamiento con FEC.

7.3. Análisis clínico.

7.3.1. Resultados de las características clínicas de los pacientes.

7.3.2. Características de la EICR.

7.3.3. Características de la FEC.

7.3.4. Variables pre-aféresis de los pacientes y de la celularidad infundida.

7.3.5. Análisis de la respuesta a FEC.

7.3.6. Análisis de los factores que se asocian a respuesta a FEC.

7.3.7. Análisis de toxicidad durante la FEC.

7.3.8. Análisis de la supervivencia y muerte relacionada con el trasplante.

7. RESULTADOS

Desde el 9 de noviembre del 2009 hasta el 25 de septiembre del 2014 fecha fijada como final de seguimiento, se realizaron un total de 419 procesos de FEC, a 24 pacientes sometidos a TPH alogénico en nuestra Unidad mediante el sistema “*off line*” de los cuales se analizaron 260. Los resultados del trabajo se organizan en los apartados que describimos en la **figura 11**.

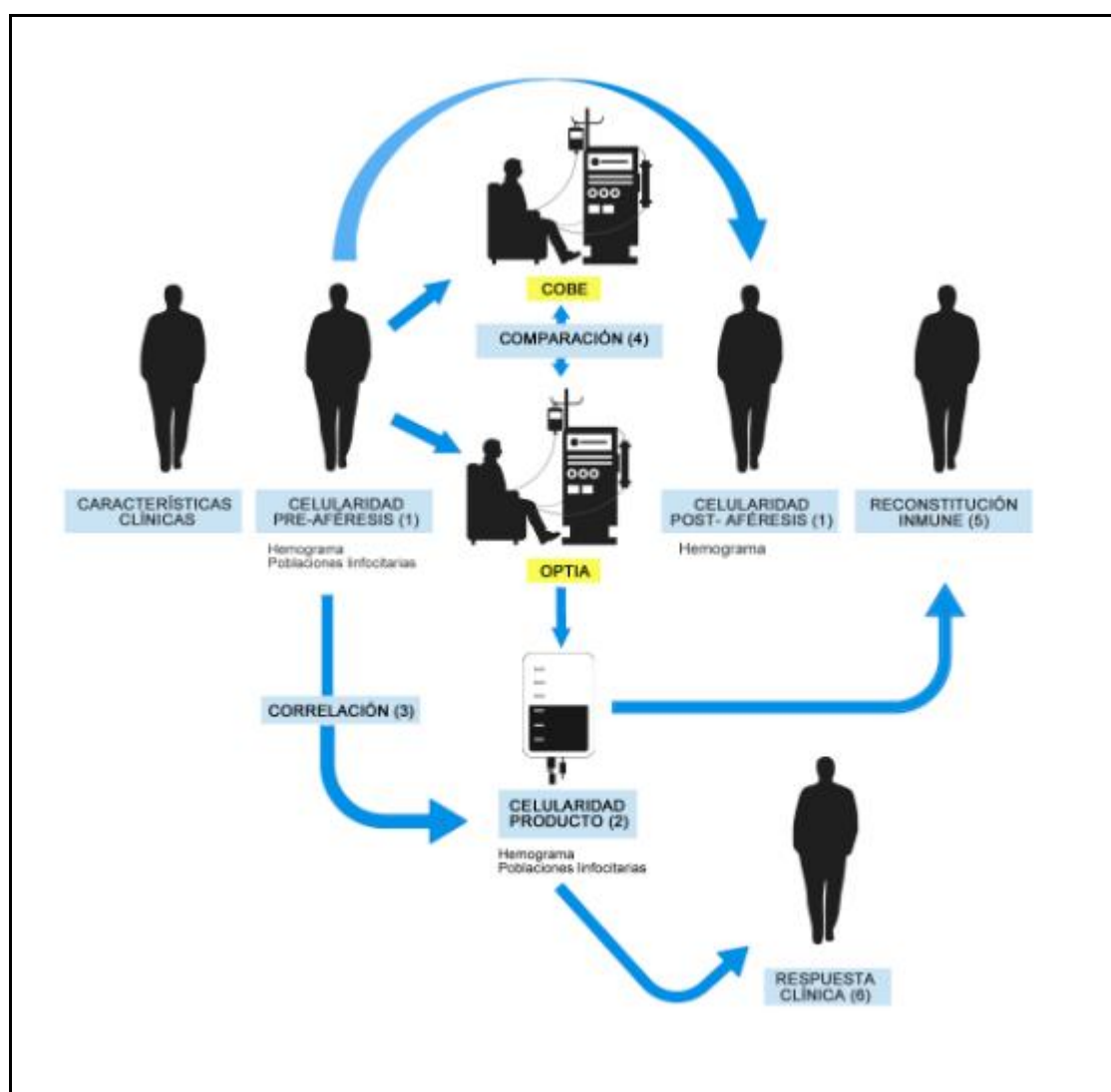


Figura 11. Esquema de resultados. (1) Valores del resultado celular pre-aféresis y post-aféresis de los procedimientos analizados. (2) Celularidad contenida en el producto y características de colecta. (3) Estudio de correlación entre celularidad pre-aféresis y celularidad contenida en el producto. (4) Estudio comparativo entre los dos dispositivos disponibles (COBE versus OPTIA). (5) Reconstitución inmune del paciente tratado. (6) Respuesta clínica del paciente.

7.1. Características clínicas de los pacientes.

En el periodo de estudio se analizaron un total de 260 procesos realizadas a los 24 pacientes, 26 tratamientos que se incluyeron en el estudio. 18 tratamientos (17 pacientes) con EICR aguda (69,3%) y 8 con EICR crónica (30,7%).

En los pacientes con **EICR aguda** la mediana de edad fue de 44 años (32-52) 5 mujeres/12 varones y con la enfermedad hematológica (3 LMA, 1 LLA, 4 SMD de alto riesgo y 4 LNH, 1MM 2 MF, 1 Síndrome linfoproliferativo autoinmune. 2 pacientes iniciaron FEC por EICR aguda persistente y 1 paciente por “*Síndrome Overlap*”. El tipo de TPH fue: en 5 pacientes de hermano HLA-idéntico, en 4 idéntico DNE. La fuente de progenitores fue en la EICR aguda en 15 (83,3%) SP, 2 (11,1%) MO y 1 (5,8%) SCU, en la EICR crónica 7 pacientes (87,5%) recibieron SP y 1 MO (12,5%). La mediana de días entre el diagnóstico de EICR e inicio de FEC fue de 29 días (15-60), la línea en la que se utilizó la FEC fue de 4 pacientes (23,5%) en segunda línea, 13 (72,2%) en tercera y 3 (16,7%) en cuarta línea. La mediana del número de procesos fueron 11(6-19), y la duración en días de 45 (20-133).

Se evaluaron 8 tratamientos de 8 pacientes con **EICR crónica**. La mediana de edad fue de 51años (39-56), 3 mujeres/5 varones y con la enfermedad hematológica 2 (25%) LMA, 1(12,5%) LLA, 1(12,5%) SMD alto riesgo y 1(12,5%) LNH folicular, 1 (12,5%) MM y 1 (12,5%) con Síndrome hemofagocítico. La mediana de días entre el diagnóstico de EICR crónica e inicio de FEC fue de 150 días (52-262), la línea en la que se utilizó la FEC fue de 2 pacientes (25%) en segunda línea, 4 (50%) en segunda y 2 (25%) en cuarta línea. La mediana del número de procesos fueron 23 (11-36), y la duración en días 160 (77-261).

Todas las características clínicas de los pacientes y las relacionadas con la FEC se detallan en la **tabla 8**.

Tabla 8. Características clínicas de los pacientes.

	EICR aguda (%)	EICR crónica (%)
Número	17	8
Sexo: mujer%/varón%	5/12 (29/71)	3/5 (38/62)
Edad años, mediana (rango)	44 (32-52)	51(39-56)
Peso (kg)	61((51-70)	55 (55-65)
<u>Enfermedad hematológica</u>		
LMA	3 (17,6)	2 (25)
LLA	1 (5,8)	1 (12,5)
SMD	4 (23,5)	1 (12,5)
Otros (LNH, MM, MF)	9 (52,9)	4 (50)
>2 líneas previo TPH	7 (41,2)	2 (25)
AUTOTPH previo	5 (29)	2 (25)
<u>Estatus previo al TPH</u>		
1ª RC EMR-	3 (17,6)	3(37,5)
2ªRC EMR-	1 (5,8)	1 (12,5)
Enfermedad visible	13 (76,4)	4 (50)
<u>Tipo de TPH</u>		
HLA Idéntico	4 (23,5)	4 (50)
HLA Idéntico no emparentado	4 (23,5)	3 (37,5)
SCU dual	1 (5,8)	0
Haploidéntico	8 (47)	1 (12,5)
Donante mujer/receptor varón	11 (64,7)	6 (75)
<u>Fuente PH</u>		
- SP	14(82,3)	7(87,5)
- MO	2 (11,7)	1(12,5)
- SCU	1 (5,8)	0

	EICR aguda (%)	EICR crónica (%)
<u>Acondicionamiento</u>		
- Mieloablativo	8 (47)	4(50)
- No mieloablativo	9 (53)	4(50)
<u>Acondicionamiento</u>		
- BUX-FLU	7 (41,2)	3 (37,5)
- BUX-FLU-CFM	7 (41,2)	0
- BUX-FLU-TIMOG	2 (11,7)	2 (25)
OTROS	1 (5,8)	3 (37,5)
CD34x 10 ⁶ /Kg infundida (mediana)	4,52	4,83
CD34 >5x10 ⁶ /Kg infundida	8 (44,4)	4 (50)
<u>Profilaxis EICR</u>		
- Csa-MTX	6 (35,3)	6 (75)
- Csa-CFM-MM	8 (47)	1(12,5)
- Otros	3 (17,6)	1(12,5)

Abreviaturas: **EICR:** enfermedad injerto contra receptor. **LMA:** leucemia mieloide aguda. **LLA:** leucemia linfocítica aguda. **SMD:** síndrome mielodisplásico. **LNH:** linfoma no Hodgkin. **MM:** mieloma múltiple. **MF:** mielofibrosis. **TPH:** trasplante de progenitores hematopoyéticos. **EMC:** enfermedad mínima residual. **RC:** remisión completa. **DNE:** donante no emparentado. **SCU:** sangre cordón umbilical. **PH:** progenitores hematopoyéticos. **SP:** sangre periférica. **MO:** médula ósea. **BUX:** busulfán. **FLU:** fludarabina. **CFM:** ciclofosfamida. **TIMOG:** timoglobulina. **Csa:** ciclosporina A. **MTX:** metotrexate. **MM:** micofenolato de mofetilo.

7.2. Análisis Biológico.

7.2.1. Análisis global de la celularidad pre-aféresis y post-aféresis de los pacientes.

Se analizaron un total de 261 procedimientos, 209 realizados en el dispositivo Cobe Spectra® y 51 realizados en el dispositivo Optia Spectra®. Los resultados de la celularidad pre y post-aféresis se muestran en la **tabla 9**.

Tabla 9. Valores pre-aféresis y post-aféresis de los pacientes en todos los procedimientos.

<u>Variable</u>	Pre-aféresis	Post-aféresis	p
	Media (RIQ) n= 260	Media (RIQ) n= 260	
Leucocitos(x10 ⁹ /L)	6,09 (3,5-8,4)	5,6 (3-7,8)	<0,01
Linfocitos (x10 ⁹ /L)	1,62 (0,6-2,4)	1,7 (0,4-2,4)	0,5
Monocitos (x10 ⁹ /L)	0,63 (0,2-0,9)	0,5 (0,2-0,8)	<0,01
Hb (gr/L)	108 (96-118)	95 (85-106)	<0,01
Hto (%)	32,07 (28,7-35)	28,3 (25-31)	<0,01
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	108 (39-166)	74,5 (31-110)	<0,01
CMN (x10 ⁹ /L)	2,2 (0,8-3,4)	–	

Abreviaturas: **RIQ:** rango intercuartil, **Hb:** hemoglobina, **Hto:** hematocrito, **CMN:** células mononucleares.

Todos los valores post-aféresis fueron menores que los pre-aféresis, excepto los linfocitos. Los valores más importantes fueron el de la Hb y del recuento de plaquetas, ambos menores en el recuento post-aféresis. La media de pérdida de Hb y de plaquetas en los valores post-aféresis fue de 1,3 gr/dl y de 36,6x10⁹/L, respectivamente.

7.2.2. Celularidad contenida en los productos y características de la colecta.

La celularidad contenida en el producto y los valores de las características de la colecta en un análisis global y diferenciado por dispositivos se muestran en la **tabla 10**.

Tabla 10. Características y resultados de la celularidad de los productos de aféresis realizados en todos los pacientes independiente y dependiendo del dispositivo utilizado.

Variable	Global n=260 Media (RIQ)	Cobe n= 201 Media (RIQ)	Optia n=59 Media (RIQ)	P
Leucocitos (x10 ⁹ /L)	14,39 (4,6-20,8)	13,8 (8,5-19,1)	16,46 (5,9-23,5)	0,4
Linfocitos (x 10 ⁹ /L)	8,1 (2,1-11)	8,24 (2,4-11)	7,51 (1,4-11)	0,2
Linfocitos%	53,04 (34,90-74)	55,9 (38,1-75)	41,3 (21,8-59)	0,1
Monocitos (x 10 ⁹ /L)	4 (0,3-5,5)	3,5 (0,3-4,9)	6,1 (0,3-6,7)	0,09
Monocitos%	26,8 (5,3-49,2)	25,7 (5,5-47)	31,2 (4,8-57,1)	0,2
CMNT x10 ⁸	36,5 (11,4-48,)	35,4 (11,7-45,9)	40,9 (9,3-68,1)	0,4
CMNTx10 ⁶ /Kg	61,6 (18,1-86,2)	60,1 (19,7-83,7)	67,3(15-120)	0,02
CNT x10 ⁸	43,1 (17,4-60,6)	41,6 (17,2-57,4)	49,4 (17,7-70,5)	<0,01
Hb (g/dl)	0,1 (0,1-0,2)	0,18 (0,1-0,2)	0,2 (0,1-0,3)	<0,01
Hto (%)	0,7 (0,3-0,8)	0,74 (0,2-0,7)	1 (0,4-1,6)	<0,01
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	385 (110-595)	432 (129-680)	193 (50-226)	<0,01
Eficiencia colecta CNT (%)	13,9 (4,9-18,9)	12,3 (4,5-17,2)	20,7(7,01-34,5)	<0,01
Eficiencia colecta CMNT (%)	28,7 (12,1-42)	27,3 (12-40,4)	34,3 (12,9-53,3)	0,05
Pérdida de plaquetas (%)	27,5 (20,5-39,6)	29,2 (22,8-41,2)	20,5(15,6-25,6)	<0,01
Volemia estimada (ml)	4334(4938-4819)	4370(3980-4819)	4191(3760-4611)	<0,01
Volumen procesado (ml)	7600 (6500-8645)	7945 (7004-9004)	6186 (5910-6819)	<0,01
Volemias procesadas	1,7 (1,5-1,9)	1,8 (1,6-2,02)	1,4 (1,3- 1,5)	<0,01
Volumen del producto (ml)	97,5 (87-113)	102 (95-115)	76,9 (60-100)	<0,01
Tiempo del procedimiento (min)	149 (137-161)	149,15 (140-160)	151 (132-168)	0,98
ACD usado (ml)	668 (582-761)	687 (602-765)	590(513- 687)	<0,01
ACD en el producto (ml)	11,7 (10-14)	12,4 (11-14)	9,08 (7-11)	<0,01

Abreviaturas: **RIQ**: rango intercuartil, **Hb**: hemoglobina, **Hto**: hematocrito, **CNT**: células nucleadas totales, **CMN**: células mononucleares, **ACD**,anticoagulante citrato dextrosa, .

En el análisis global, el recuento de CNT total fue de $43,1 \times 10^8$ (RIQ:17,4-60,6), de leucocitos fue de $14,3 \times 10^9/L$ (RIQ:4,6-20,8), el de linfocitos $8,1 \times 10^9/L$ (RIQ:2,1-11), que suponen el 54% de la población de células nucleadas, el de monocitos fue de $4 \times 10^9/L$ (RIQ:0,3-5,5) representando el 27% de las células nucleadas, las CMNT de $36,52 \times 10^8$ (RIQ:11,47-48,52) y las **CMNTx10⁶//kg de 61,6 (18,1-86,2)**. Los valores de Hb y Hct 0,1gr/L y 0,7% respectivamente y el recuento de plaquetas de $385 \times 10^9/L$ (RIQ:110-595). El volumen final de todos los productos fue de 300 ml.

La volemia media estimada de los pacientes fue de 4335 ml (RIQ:4938-4819), el volumen medio procesado fue de 7600 ml (RIQ:6500-8645), la volemia media 1,7 (RIQ:1,5-1,9 ml), el volumen del producto 97,5 ml (RIQ:87-113), tiempo de procedimiento 149 min (RIQ:137-161), ACD usado 668,1 ml (RIQ:582-761) y el ACD contenido en el producto 11,7 ml (RIQ:10-14). La eficiencia de colecta de CN, de CMN y la pérdida de plaquetas en % fueron de 13,9% (RIQ:4,9-18,9), 28,7% (RIQ:12,1-42), 27,5% (RIQ:20,5-39,6), respectivamente.

7.2.3. Correlación entre la celularidad pre-aféresis del paciente y la del producto.

El Coeficiente de Correlación (CR), independiente y dependiente del dispositivo utilizado entre la celularidad del paciente pre-aféresis y la presente en el producto se detallan en la **tabla 11**.

Tabla 11. Correlaciones entre la celularidad pre-aféresis y la contenida en el producto independiente y dependiendo del dispositivo utilizado.

Variable	Global N=260 CR	<u>Cobe</u> (n=209) CR	<u>Optia</u> (n=51) CR	p
Leucocitos ($\times 10^9/L$)	0,25	0,27	0,27	<0,01
Linfocitos ($\times 10^9/L$)	0,44	0,39	0,66	<0,01
Monocitos ($\times 10^9/L$)	0,57	0,35	0,40	<0,01
Hb (g/dl)	0,09	-0,21	-0,00	<0,01
Hto (%)	0,06	0,13	0,09	<0,01
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	0,75	0,74	0,91	<0,01

El CR entre los linfocitos y los monocitos fueron muy buenas y mucho mejor que con el resto de variables analizadas en todos los análisis, con los valores más altos en el dispositivo Optia®. (*todos los valores $p < 0,01$*)

7.2.3.1. Correlación dependiendo del dispositivo y del recuento de leucocitos pre-aféresis del paciente.

Los resultados de CR entre los valores pre-aféresis y los contenidos en el producto realizados en el dispositivo **Cobe Spectra®** se detallan en la **tabla 12**.

Tabla 12. Correlación dependiendo del recuento de leucocitos pre-aféresis (<2,5, 2,5-7,5, >7,5 $\times 10^9/L$) en dispositivo Cobe Spectra.

Dispositivo Cobe Spectra®						
Recuento de leucocitos en sangre periférica	Leucocitos ($\times 10^9/L$)	Linfocitos ($\times 10^9/L$)	Monocitos ($\times 10^9/L$)	Hb (gr/dl)	Hto (%)	Plaquetas ($\times 10^9/L$)
<2.5 ($\times 10^9/L$) n=29	0,36	0,75	0,21	-0,36	-0,27	0,49
2.5-7.5 ($\times 10^9/L$) n=112	0,04	0,41	0,49	0,19	0,15	0,73
>7.5 ($\times 10^9/L$) n=68	-0,16	0,08	0,42	0,45	0,20	0,53

El CR con el dispositivo **Cobe Spectra®** dependiendo del recuento de leucocitos pre-aféresis fue variable y no se objetivó una disminución con mayor recuento de leucocitos pre-aféresis. El CR de los linfocitos empeoró con el aumento de leucocitos pre-aféresis y el CR más fuerte resultó con el recuento de leucocitos pre-aféresis de <2,5 $\times 10^9/L$ y especialmente bajo con leucocitos de >7,5 $\times 10^9/L$ de El CR en monocitos fue variable según los leucocitos pre y la mejor CR fue con leucocitos pre-aféresis 2,5-7,5 $\times 10^9/L$.

Los resultados de CR entre los valores pre-aféresis y los contenidos en el producto realizados en el dispositivo Spectra Optia® dependiendo del número de leucocitos pre-aféresis se detallan en la **tabla 13**.

Tabla 13. Correlación dependiendo del recuento de leucocitos pre-(<2,5, 2,5-7,5, >7,5 $\times 10^9/L$) en dispositivo Spectra Optia.

Dispositivo Spectra Optia®						
Recuento de leucocitos en sangre periférica	Leucocitos ($\times 10^9/L$)	Linfocitos ($\times 10^9/L$)	Monocitos ($\times 10^9/L$)	Hb (gr/dl)	Hto (%)	Plaquetas ($\times 10^9/L$)
<2.5 $\times 10^9/L$ n=11	0,49	0,53	0,21	-0,36	-0,27	0,49
2.5-7.5 $\times 10^9/L$ n=23	0,36	0,49	0,70	-,38	0,49	0,90
>7.5 $\times 10^9/L$ n=17	-0,25	0,53	0,53	-0,5	-0,14	0,82

En el dispositivo **Spectra Optia®** el CR entre los leucocitos pre-aféresis y los del producto presentó resultados variables. Para los linfocitos el mejor CR fue para leucocitos pre de $<2.5 \times 10^9/L$ y $>7.5 \times 10^9/L$. Para los monocitos el mejor CR fue para recuentos de leucocitos preaféresis de $2.5-7.5 \times 10^9/L$. En todos los casos el coeficiente de correlación del recuento de plaquetas resultó muy fuerte. En conclusión, se obtuvieron unas correlaciones muy buenas para linfocitos y monocitos y plaquetas, no así con el resto de las variables. No se objetivó una clara mejoría de la correlación con un menor recuento de leucocitos pre-aféresis.

7.2.4. Eficiencia de colecta: comparación entre los 2 dispositivos de colecta.

Incluimos un total de 114 procedimientos (63 realizados en Cobe® y 51 en Optia®) realizados en 9 de los 24 pacientes incluidos en el estudio (7 pacientes con EICR crónica y 2 con EICR aguda). Los datos pre y post-aféresis de los pacientes se detallan en la **tabla 14**.

Tabla 14. Recuentos en sangre periférica antes y después del proceso de leucoaféresis con Cobe Spectra® y Spectra Optia® en pacientes en tratamiento con FEC.

Variable	Pre-aféresis Media (RIQ)		p	Post-aféresis Media (RIQ)		p
	Cobe (n=63)	Optia(n=51)		Cobe (n=63)	Optia (n=51)	
Leucocitos ($\times 10^9/L$)	7,3 (5,3-8,6)	6,2 (3-8,8)	0,11	6,7 (5,1-8,1)	5,4 (2,4-7,9)	0,05
Linfocitos ($\times 10^9/L$)	2,2 (1,5-3,4)	1,5 (0,2-2,6)	0,01	2,2 (1,1-3,0)	1,3 (0,2-2,4)	0,04
Monocitos ($\times 10^9/L$)	0,8 (0,4-1,1)	0,7 (0,2-1,1)	0,36	0,7 (0,4-0,9)	0,5 (0,2-0,7)	0,02
Hb (g/dl)	10,7 (9,8-11,6)	10,3 (9,3-11,1)	0,06	9,3 (8,5-10,1)	9,5 (8,3-9,9)	0,93
Hto (%)	32,4 (30,2-35,5)	30,9 (27,6-33,6)	0,02	28 (26-31,7)	28 (24,2-29,9)	0,42
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	142 (49-187)	52 (34-169)	0,09	84 (36-123)	44 (29-128)	0,5
CMN ($\times 10^9/L$)	3,2 (2,3-4,2)	2,5 (0,5-3,9)	0,02			

Abreviaturas: **RIQ**: rango intercuartil, **Hb**: hemoglobina, **Hto**: hematocrito, **CMN**: células mononucleares.

En los valores pre-aféresis se objetivaron diferencias significativas entre el recuento de linfocitos pre y en el hematocrito siendo ambos menores en el grupo de Optia®. En los valores post-aféresis se encontraron diferencias significativas en el recuento de leucocitos, linfocitos, monocitos siendo menores en el grupo de Optia®.

La celularidad del producto y las características de la colecta se detallan en la **tabla 15**.

Tabla 15. Celularidad y eficiencia de colecta de los productos de aféresis realizados con los dispositivos Cobe Spectra® y Spectra Optia®.

Variable	<u>Cobe</u>	<u>Optia</u>	p
	(n=63)	(n=51)	
	Media (RIQ)	Media (RIQ)	
Leucocitos x10 ⁹ /L	11,8 (4,6-20,8)	11 (5,9-23,5)	0,56
Linfocitosx10 ⁹ /L	7,7 (2,1-15,6)	3,1 (1,4-11)	0,18
Monocitosx 10 ⁹ /L	2,7 (0,7-5,1)	3,9 (0,3-8)	0,44
CMNT x 10 ⁸	33,60 (11,7-62,4)	24,90 (9,3-68,1)	0,46
CMNT x10 ⁶ /kg	68,6(17,9-101,1)	67,3 (15 -120,4)	0,61
CNT x 10 ⁸	35,4 (13,8-62,4)	33 (17,7-70,5)	0,56
Hb (g/dl)	0,1 (0,1-0,2)	0,2 (0,1-0,3)	<0,001
Hto (%)	0,4 (0-0,6)	0,8 (0,4-1,6)	<0,001
Plaquetas (x 10 ⁹ /L)	469 (124-808)	97 (50-226)	<0,001
Eficiencia colecta CNT (%)	7,6 (4-14,7)	16,7 (7-34,5)	<0,001
Eficiencia colecta CMNT (%)	18,3 (7,9-35,7)	33,1 (12,9-53,3)	0,004
Pérdida de plaquetas (%)	35,6 (29,4-40,8)	20,9 (15,6-25,6)	<0,001
Volemia (ml)	4671 (3973-4851)	3919 (3760-4611)	0,001
Volumen procesado (ml)	8220 (7392-9171)	6087 (5591-6819)	<0,001
Volemias procesadas	1,8 (1,6-2)	1,5 (1,3-1,5)	<0,001
Volumen del producto (ml)	109 (101-119)	80 (60-100)	<0,001
Tiempo del procedimiento (min)	154 (145-166)	150 (132-168)	0,25
ACD usado (ml)	696 (626-782)	595 (513-687)	<0,001
ACD en el producto (ml)	13 (12-14)	8 (7-11)	<0,001

En los datos obtenidos de los productos de aféresis se objetivó que el volumen procesado, el volumen del producto y la cantidad de ACD usado en las colectas fueron significativamente menores en el grupo **Optia®**. Los valores de Hb y el Hct fueron más altos en el grupo **Optia®** y el recuento de CMNT fue similar en ambos dispositivos. De forma notable se objetivó que la eficiencia de colecta de las CMNT y la pérdida de plaquetas fueron mucho mejores con la **Optia®** ($p < 0,004$ y $p < 0,001$, respectivamente.)

7.2.5. Análisis de las subpoblaciones linfocitarias en el producto.

Se analizaron 230 procedimientos hasta la fecha de último seguimiento. Los resultados del análisis se detallan en la **tabla 16**.

Tabla 16. Descriptivo de frecuencias de subpoblaciones linfocitarias pre-aféresis en el paciente y en el producto.

n= 230	Celularidad pre-aféresis. Media (RIQ)	Celularidad producto. Media (RIQ)
Leucocitos $\times 10^9/L$	6,2 (3,6-8,4)	15,4(6,8-20,8)
CD3 $\times 10^9/L$	0,9(0,2-1,2)	7,07 (1,7-9,4)
CD3+%	16,7(5,7-25,7)	44,3(24,8-60,7)
CD3+CD4 $\times 10^9/L$	0,3(0,08-0,4)	2,5 (0,6-3,2)
CD3+CD4+%	7,4(1,9-0,4)	16,8 (7,8-19)
CD3+CD8 $\times 10^9/L$	0,5 (0,1-0,7)	4,5(0,6-5,5)
CD3+CD8+%	11,6(2,7-17,6)	25,9(11-38,4)
CD19 $\times 10^9/L$	0,1(0,05-0,1)	1,2 (0,03-1,1)
CD19+%	3,08(0,1-2,5)	7,6 (0,4-7,6)
NK $\times 10^9/L$	0,1(0,04-0,1)	1,05(0,4-1,3)
NK%-Pre	2,6(0,9-2,8)	12,8(4-11,9)

El contenido de las subpoblaciones linfocitarias (SPL) en el producto fue variable siendo la SPL CD3+CD8+ la mayor con un valor medio de $4,5 \times 10^9/L$ (RIQ: $0,6-0,5 \times 10^9/L$), valor absoluto en la bolsa $13,10 \times 10^8$ (volumen de la bolsa 300 ml) es decir con respecto al valor medio pre-aféresis, se consiguió enriquecer el producto 7,64 veces.

El rendimiento medio de las subpoblaciones fue similar en todas y se detalla en la **tabla 17**.

Tabla 17. Valores absolutos de las subpoblaciones linfocitarias contenido en el producto y rendimiento en la colecta.

SPL n= 230	Valores absolutos del producto ($\times 10^8$) Media (RIQ)	Rendimiento % Media (RIQ)
CD3+	20,5 (5,2-27,3)	30,1 (19-40,5)
CD3+CD4+	7,3 (1,8-8,6)	32,6(19-44,3)
CD3+CD8+	13,1 (1,9-16,4)	31,3 (16,9-42,1)
CD19+	3 (0,09-3,1)	34 (14-48,2)
NK	3 (1,3-3,7)	41,8 (18,5-58,2)

* Volumen de la bolsa: 300 ml.

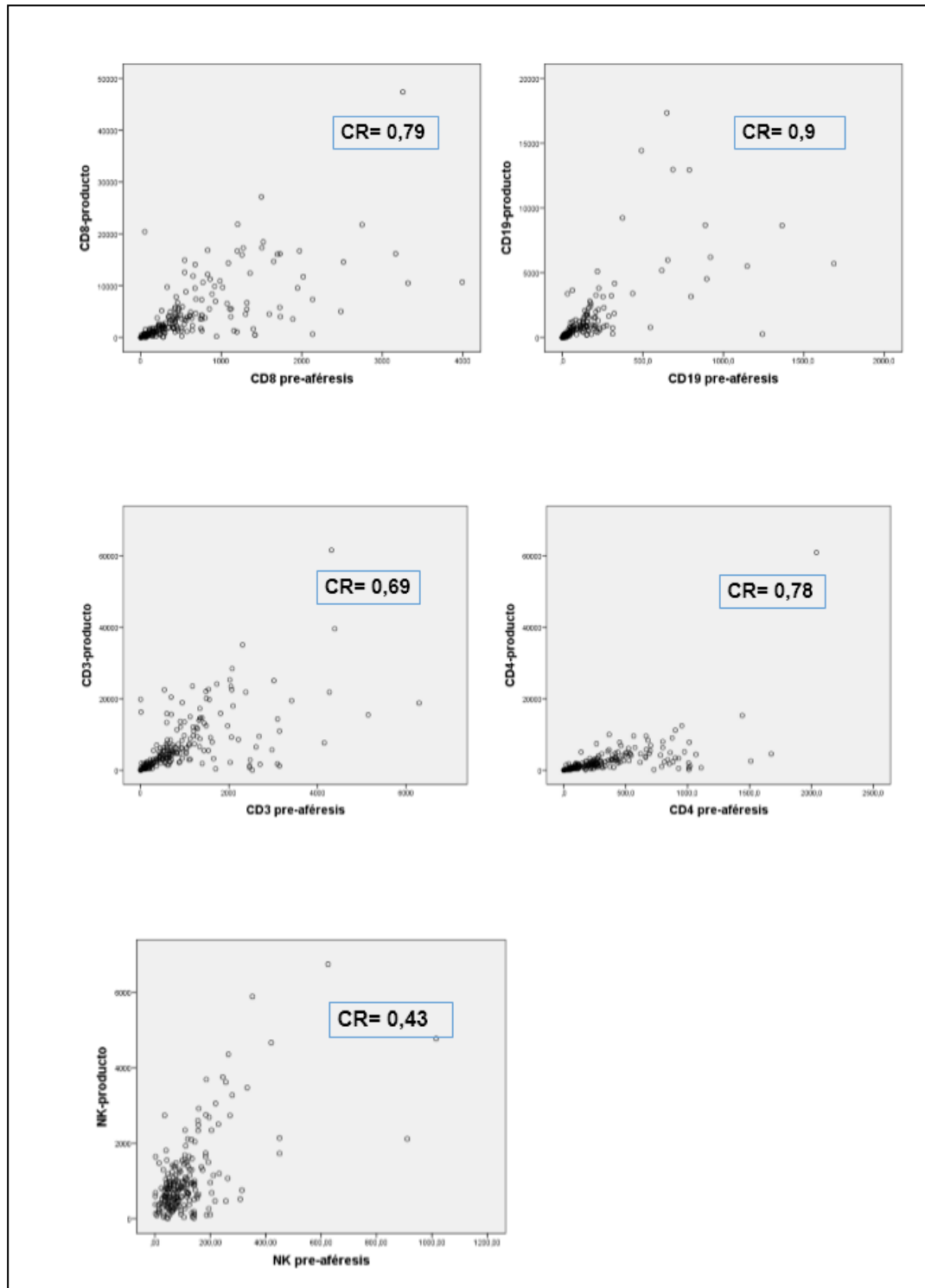
La correlación de las SPL CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+, NK entre los valores pre-aféresis y las contenidas en el producto presentaron muy buena relación lineal, CR= 0,69, 0,78, 0,79, 0,9, 0,43 respectivamente y se detalla en la **tabla 18**.

Tabla 18. Correlación entre las subpoblaciones linfocitarias pre-aféresis y con los contenidos en el producto dependiendo del recuento leucocitario pre-aféresis.

Recuento de leucocitos en sangre periférica	n	CD3+ CR	CD3+CD4+ CR	CD3+CD8+ CR	CD19+ CR	NK CR	p
Independiente de recuento leucocitario	230	0,69	0,78	0,79	0,90	0,43	<0,01
<1.5 $\times 10^9/L$	16	0,83	0,92	0,92	0,44	0,17	<0,01
<2.5 $\times 10^9/L$	31	0,88	0,90	0,92	0,68	0,43	<0,01
2.5-7.5 $\times 10^9/L$	127	0,64	0,81	0,77	0,91	0,37	<0,01
>7.5 $\times 10^9/L$	72	0,59	0,56	0,69	0,80	0,53	<0,01

En conclusión, los productos de FEC infundidos analizados presentaron dosis variables de SPL, con una población T mayoritaria con predominio de CD8+. Se observó un CR significativo entre las concentraciones de LT, B y NK pre-aféresis y productos infundidos, siendo la de la población NK la de menor correlación. El CR fue mejor con menor recuento leucocitario pre-aféresis. El rendimiento medio de las subpoblaciones linfocitarias fue del 35%.

Figura 12. Representación gráfica de la correlación de todas las SPL independiente del recuento de leucocitos pre-aféresis.



7.2.6. Reconstitución inmune en el paciente después de FEC.

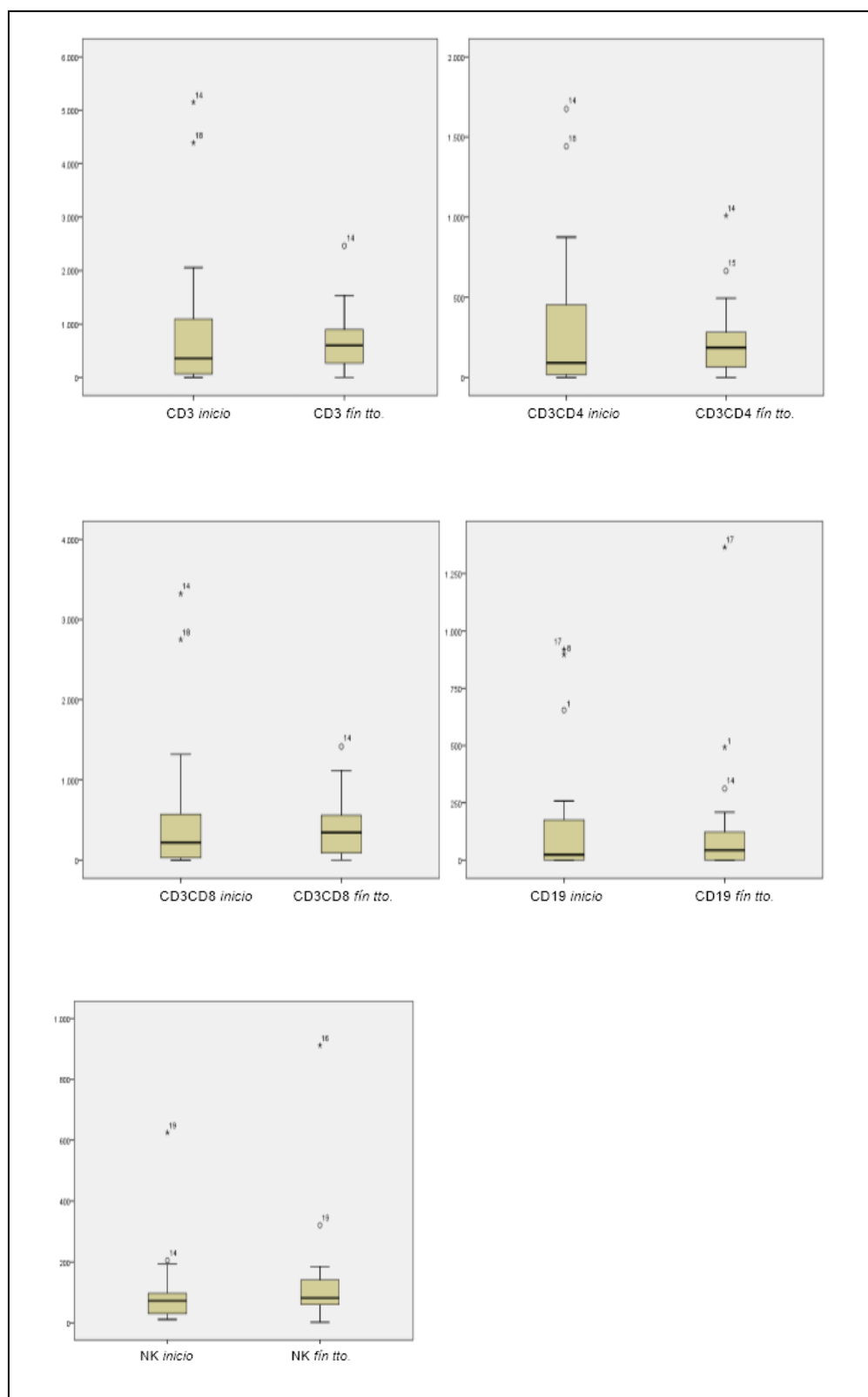
Este análisis se realizó en 22 de los 24 pacientes de forma global a los pacientes con EICR agudo y crónico. 2 pacientes fueron excluidos por no cumplir con los datos necesarios para el análisis. Los valores de SPL al inicio del tratamiento con FEC y al finalizar se detallan en la **tabla 19**.

Tabla 19. Valores de SPL antes del inicio de FEC y al final del tratamiento.

	Pre- FEC	Post- FEC	P
	Mediana(RIQ)	Mediana(RIQ)	
Leucosx10 ⁹ /L	6,05 (3,22-8,85)	4,60 (1,87-7,97)	0,4
CD3+x10 ⁹ /L	0,35 (0,06-1,16)	0,6 (0,25-0,99)	0,6
CD3+CD4+x10 ⁹ /L	0,09 (0,01-0,46)	0,18 (0,06-0,29)	0,9
CD3+CD8+x10 ⁹ /L	0,21 (0,03-0,61)	0,34 (0,08-0,58)	0,5
Ratio CD4/CD8	0,21	0,54	0,4
CD19+x10 ⁹ /L	0,02 (0,0009-0,11)	0,43 (0,0009-0,13)	0,8
NK+x10 ⁹ /L	0,07 (0,03-0,10)	0,08 (0,05-0,14)	0,7

Todas las SPL aumentaron al finalizar el tratamiento con FEC. La población CD3+ aumentó 1,71 veces, la población CD3+CD4+ aumentó en 2 veces, la población CD3+CD8+ 1,6 veces, la población CD19+ en 21 veces y la población NK 1,2 veces. (Figura 13). Los resultados demostraron que la población de linfocitos T que más aumentó fue la CD3+CD4+ y que el ratio CD4/CD8 mejoró después del tratamiento con FEC. No se encontraron diferencias significativas en la evolución de las SPL en relación a la respuesta clínica FEC.

Figura 13. Representación gráfica de la evolución de las SPL al inicio y al finalizar la FEC.



Mediana y RIQ de los valores de las SPL CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+ y NK al inicio y tras la finalización del tratamiento con FEC.

7.3. ANÁLISIS CLÍNICO.

7.3.1. Resultados de las características clínicas de los pacientes.

En el periodo de estudio se analizaron finalmente un total de **17 tratamientos de 16 pacientes** con EICR aguda (69,3%) y 8 tratamientos de 8 pacientes con EICR crónica (30,7%) y con las características clínicas ya referidas en la **tabla 8**.

7.3.2. Características de la EICR.

Las características de la EICR se detallan en la **tabla 20**.

Tabla 20. Características de EICR (afectación por órganos).

	EICR aguda (%) n= 17	EICR crónica (%) n= 8
<u>Grado clínico EICR aguda</u>		
- II	3 (17,6)	
- III	9 (52,9)	
- IV	5(29,4)	
Grado clínico EICR aguda II	3(17,6)	
Grado clínico EICR aguda II-IV	14(82,3)	
EICR aguda cutáneo	11 (61)	7 (87,5)
EICR aguda intestino	9 (50)	1 (12,5)
EICR aguda hígado	9 (50%)	3 (37,5)
<u>Afectación 1 órgano</u>		
Si	8 (47)	3 (37,5)
No	9 (53)	5 (62,5)
EICR crónica muco-cutáneo		7 (87,5)
EICR crónica intestino		1 (12,5)
EICR crónica hígado		3 (37,5)
EICR crónica pulmón		3 (37,5)
Afectación > 1 órgano		58 (62,5)
Grado clínico EICR crónica NIH		
- Moderado		5 (62,5)
- Grave		3 (37,5)

En los pacientes con **EICR aguda**, 3 (17,6%) presentaron EICR grado II, 9 (50%) grado III y en 5 (29,4%) grado IV. El 82,3% de los pacientes presentaron grado II-IV. 11 (61%) pacientes tuvieron afectación cutánea, 9 (50%) afectación intestinal y 9 (50%) tuvieron afectación hepática. El 52,9% de los pacientes presentaron afectación de más de 1 órgano.

En los pacientes con **EICR crónica**, 7(87,5%) presentaron afectación muco-cutánea, 1(12,5%) afectación intestinal, 3 (37,5%) hepática y 3 (37,5%) afectación pulmonar. 5 de ellos (62,5%) presentaron afectación de más de 1 órgano.

7.3.3. Características de la FEC y tratamiento inmunosupresor concomitante.

Las características de la FEC y el tratamiento inmunosupresor concomitante se detallan en la **tabla 21**.

Tabla 21. Características de la FEC y tratamiento inmunosupresor concomitante.

	EICR aguda / (%) n=17	EICR crónica / % n=8
Días entre dx de EICR e inicio de FEC (Mediana)	29 (15-60)	150 (52-262)
Líneas de tratamiento previo a FEC		
- 1	4 (23,5)	2(25)
- 2	10 (58,8)	4(50)
- 3	3 (17,6)	2(25)
Tratamiento IS previo a FEC (combinaciones más frecuentes)		
	CT+CsA+MMF (7)	CT+CsA+MMF+Imatinib
	CT+CsA (2)	CT+CsA+MMF+Fk3
	CT+CsA+MMF+ATG (2)	CT+MMF+ATG
	OTROS (6)	CT+MMF+Tac (2)
		CT+Csa
		CT+Csa+MMF
		CT+MMF

	EICR aguda / (%) n=17	EICR crónica / % n=8
<u>Línea en que se utilizó FEC</u>		
- 2ª	4 (23,5)	2 (25)
- 3ª	10 (55,5)	4 (50)
- 4ª	3 (16,7)	2 (25)
<u>Indicación FEC</u>		
- Cortico-dependiente	5 (29,4)	7 (87,5)
- Cortico-refractaria	12 (70,5)	1 (12,5)
Nº de procesos FEC (Mediana-rango)	11 (6-19)	23 (11-36)
Duración en días de FEC (Mediana-rango)	45 (20-133)	160 (77-261)
Nº de procesos hasta respuesta (Mediana-rango)	2 (2-10)	5 (2-6)
Días entre inicio FEC y respuesta	4 (2-36)	20 (12-28)
Días entre inicio FEC y reducción de CT	8 (1-12)	18 (11-31)
%Reducción de CT al final de FEC	90 (15-100)	100 (85-100)
Quimerismo completo al mes de inicio de FEC	15 (88,2)	7 (87,5)

Abreviaturas: EICR: enfermedad injerto contra receptor. FEC: fotoféresis extracorpórea. TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos. BUX: busulfán. FLU: fludarabina. CFM: ciclofosfamida. TIMOG: timoglobulina. Csa: ciclosporina A. MTX: metotrexate. MMF: micofenolato de mofetilo.

La mediana de días entre el diagnóstico de **EICR aguda** e inicio de FEC fue de 29 días (15-60), la línea en la que se utilizó la FEC fue de 4 pacientes (23,5%) en segunda línea, 13 (72,2% en tercera y 3 (16,7%) en cuarta línea. La indicación de FEC fue en 5 (27,8%) casos por EICR cortico-dependiente y 13 (72,2%) cortico-refractaria. El número medio de procesos fueron 11(RIQ: 6-19), y duración en días 45 (RIQ: 20-133). El número de procesos hasta respuesta fue de 2 (RIQ: 2-4), los días hasta inicio de respuesta fue de 5 (2-12) y los días desde el inicio de FEC y la reducción de la dosis de CT fue de 8 días (1-12). **La reducción de esteroides al final del tratamiento fue del**

90% (RIQ: 15-100%). El seguimiento desde el TPH hasta éxitus o final de seguimiento fue de 16 meses (RIQ: 10-21). El seguimiento de EICR fue de 12 meses (RIQ: 6-17). La supervivencia global desde el inicio de FEC fue de 8 meses (RIQ: 2,6-15,6). El quimerismo al mes del inicio de FEC fue completo en 15 (88,2%). El resto el quimerismo fue mixto antes del inicio de FEC. **El status al final del seguimiento fue de 7 vivos (41,1%) y 10 éxitus (58,8%).**

La mediana de días entre el diagnóstico de **EICR crónica** e inicio de FEC fue de 150 días (RIQ: 52-262), la línea en la que se utilizó la FEC fue en 2 pacientes (25%) en segunda línea, 4 (50%) en tercera y 2 (25%) en cuarta línea. La indicación de FEC en 7 (87,5%) cortico-dependiente en 1(12,5%) cortico-refractario. El número de procesos fueron 23 (11-36), y duración en días 160 (77-261). La mediana de días desde el inicio de FEC y la reducción de esteroides fue de 18 días (11-12). La reducción de esteroides al final del tratamiento fue del 100% (85-100%). El seguimiento desde el TPH hasta éxitus o final de seguimiento fue de 25 meses (19-42). El seguimiento de EICR fue 10 meses (19-42). El quimerismo al mes del inicio de FEC fue completo en 7 (87,5%). La supervivencia global desde el inicio de FEC fue de 9 meses (4-15). El status al final del seguimiento fue de 3 vivos (37,5%) 5 éxitus (62,5%).

7.3.4. Variables pre-aféresis de los pacientes y celularidad infundida.

Los resultados de la celularidad pre-aféresis de los pacientes en el grupo de la EICR aguda y crónica se detallan en la **tabla 22**.

Tabla 22. Celularidad de los pacientes pre-aféresis

	EICR aguda n=17	EICR crónica n=8	
	Mediana (rango IQ)	Mediana (rango IQ)	p
Leucocitos pre $\times 10^9/L$	5,7 (3,2-7,5)	9,3 (8,4-10,3)	0,03
Linfocitos%	13 (4,5-38)	28,5 (18,1-55,9)	0,1
Linfocitos $\times 10^9/L$	0,6 (0,12-1,1)	2,4 (1,8-5,7)	0,03
Monocitos%	8,6 (5,3-17,8)	7,1 (3,9-10,9)	0,4
Monocitos $\times 10^9/L$	0,4 (0,2-0,8)	0,5 (0,1-1,1)	0,8
Hb gr/dl	10,7 (9,4-12,1)	13,3 (12-14,3)	0,005
Hct %	30,4 (25,4-37,5)	39,6 (29,9-44,9)	0,005
Plaquetas $\times 10^9/L$	91 (50-126)	107 (49-217)	0,6

En el análisis de los recuentos celulares pre-aféresis, hubo diferencias en el valor de los leucocitos, linfocitos, Hb y Hct que fueron menores en el grupo de EICR aguda. ($p < 0.01$)

La celularidad infundida y la acumulada en cada proceso al final de los primeros 8 procesos y al final del tratamiento en los pacientes con EICR aguda y en los pacientes con EICR crónica se detallan en la **tabla 23**.

Tabla 23. Celularidad infundida a los pacientes tratados con FEC.

	EICR aguda n=17	EICR crónica n=8	
	Mediana (rango)	Mediana (rango)	p
Valores medios de los 1^{os} 8 procedimientos			
Media de CMNT×10 ⁶ /kg	39,3 (18,4-72,7)	112 (67,8-132)	0,02
Media CMNT×10 ⁸	24,7 (12,5-40,9)	69,6 (37,3-73)	0,1
Media CNT×10 ⁶ /kg	58,1 (26,8-78)	113 (78,3-139)	0,1
Media CNT×10 ⁸	28,5(17-48,8)	73,6 (45,3-76,8)	0,2
CD3+CD4+x10 ⁸	2,2 (0,8-8,3)	9,6 (5,5-22)	0,04
CD3+CD8+ x10 ⁸	3,3 (1,06-19,02)	12 (6,7-30,4)	0,1
CD19+ x10 ⁸	0,4 (0,008-1,7)	4,8 (2,5-9,5)	0,03
NK x10 ⁸	2,2 (1,4-3,6)	3,1 (1,9-3,9)	0,3
Valores medios evaluado al proceso 8^o acumulado			
Media de CMNT×10 ⁶ /kg	332(136-546)	899 (542-1062)	0,01
Media CMNT×10 ⁸	217(79,5-318)	556 (298-584)	0,01
Media CNT×10 ⁶ /kg	24150 (13415-39075)	58920 (36270-61500)	0,01
Media CNT×10 ⁸	492 (238-593)	906 (627-1118)	0,02
CD3+CD4+x10 ⁸	15,5 (6,2-54,5)	67,5 (44-176)	0,03
CD3+CD8+ x10 ⁸	21,4 (8,5-152,1)	108 (53,9-213)	0,01
CD19+ x10 ⁸	2,4 (0,06-14,3)	38,7 (17,2-66,9)	0,03
NK x10 ⁸	17,5 (11,1-29,4)	20,4 (15,3-31,6)	0,2
Valores medios evaluado al final del tratamiento			
Media de CMNT×10 ⁶ /kg	50,8 (25,0-64,9)	68 (43,5-112)	0,1
Media CMNT×10 ⁸	31,1 (17,5-36,5)	37,4 (27,4-67,05)	0,2
Media CNT×10 ⁶ /kg	62 (29,9-74,9)	85,7 (43,8-118)	0,1
Media CNT×10 ⁸	37,8 (21-45,9)	47,1 (27,6-69,5)	0,2
CD3+CD4+x10 ⁸	2,3 (0,5-4,3)	6,8 (5-15,5)	0,08
CD3+CD8+ x10 ⁸	4,4 (1,2-15,9)	11,8 (4,9-28,5)	0,06
CD19+ x10 ⁸	0,3 (0,01-3,1)	2,6 (1,7-8,5)	0,06
NK x10 ⁸	2,2 (1,7-4,8)	2,4 (1,4-4,6)	1

	EICR aguda n=17	EICR crónica n=8	p
	Mediana (rango)	Mediana (rango)	
Valores acumulados evaluado al final del tratamiento			
Media de CMNT $\times 10^6/\text{kg}$	684 (298-1078)	2246 (1237-2674)	0,02
Media CMNT $\times 10^8$	431 (210-574)	1235 (804-1444)	0,03
Media CNT $\times 10^6/\text{kg}$	5350 (30097-73215)	143974 (83460-196830)	0,05
Media CNT $\times 10^8$	893 (423-1216)	2617 (1284-3639)	0,03
CD3+CD4 $\times 10^8$	63,4 (21,7-99,1)	234 (96,7-294)	0,04
CD3+CD8+ $\times 10^8$	39 (12,7-205)	314 (111-469)	0,01
CD19+ $\times 10^8$	2,4 (0,07-47,1)	78,4 (59,1-94,1)	0,01
NK $\times 10^8$	35,4(21,4-78,1)	53,7(34,2-138)	0,1

Toda la celularidad infundida en términos de CMNT y SPL fue mayor en el grupo de los pacientes con EICR crónica que en el de la EICR aguda. La población linfocitaria CD3+CD8+ fue la mayoritariamente infundida en los 2 grupos.

7.3.5. Análisis de la respuesta clínica a la FEC

Las respuestas en la EICR aguda se pudieron analizar en 17 tratamientos (1 paciente solo realizó 2 procedimientos y se consideró no evaluable para este análisis) y los resultados se muestran en la **tabla 24**.

Tabla 24. Respuestas globales al tratamiento FEC.

	EICR aguda (%)	EICR crónica (%)
	n= 17	n= 8
Respuesta Completa	8 (47,0)	3 (37,5)
Respuesta parcial	2(11,7)	3 (37,5)
No respuesta	7(41,1)	2 (25)

En el grupo a **EICR aguda** las respuestas globales a la FEC al final del tratamiento fueron de un 58%: respuesta completa en 8 pacientes (47%) y respuesta parcial en 2 (11,7%) y no respuesta en 7(41,1%) de los tratamientos analizados.

En el grupo de la **EICR crónica**, las respuestas globales fueron de un 65%: 3 (37,5%) pacientes presentaron respuesta completa, y 3 (37,5%) pacientes respuesta parcial. 2 (25%) pacientes no respondieron.

La respuesta a la FEC por órganos se detalla en la **tabla 25**.

Tabla 25. Respuesta por órganos a la FEC

	EICR aguda / (%) n= 17	EICR crónica / % n= 8
Respuesta EICR cutáneo	RC 8/11 (72,7)	RC 4/7 (51) RP 2/7 (28,5)
Respuesta EICR intestinal	RC 3/9 (33,3) RP 3 /9 (33,3) NR 3/9 (33,3)	RC 1/1 (100)
Respuesta EICR hepático	RC 3/9 (33,3) RP 1/9 (11,1) NR 5/9 (55,6)	RC 1/3 (33,3) RP 1/3 (33,3)
Respuesta EICR crónica pulmón		RP 2/3 (66,6)

En los pacientes con **EICR aguda**, hubo respuesta completa en la EICR cutánea de un 72,7%, en la EICR aguda intestinal, una respuesta del 66% (RC= 33%, RP=33%) y en la EICR aguda hepático del 44% (RC= 33%, RP= 11%)

En la **EICR crónica**, en la EICR muco-cutánea hubo respuesta en el 79% de los pacientes (RC= 51%, RP= 28,7%). En la EICR crónica intestinal la respuesta fue del 100% (solo 1 paciente presentó esta sintomatología) y en la EICR hepática la respuesta fue del 66% (RC= 33%, RP=33%). En la EICR crónica pulmonar hubo 2 respuestas parciales (66,6%).

7.3.6. Análisis de los factores clínicos y de celularidad infundida asociados a respuesta clínica a FEC.

El análisis de la asociación a la respuesta a FEC según las características de cada paciente se detalla en la tabla 26.

Tabla 26. Asociación a la respuesta a FEC según las características de cada paciente.

	EICR aguda n=17		p	EICR crónica n=8		p
	NR (%)	R (RC+RP) (%)		NR (%)	R (RC+RP) (%)	
Edad años, mediana (rango)	52 (42-56)	34 (28-49)	0,03	49 (42-50)	51 (37-59)	0,8
Sexo M/V	3/4	3/7	0,3	2/1	0/5	0,5
<u>Enfermedad hematológica</u>						
- LMA	1 (14,3)	3 (30)	0,2	1 (50)	1 (16,7)	0,1
- LLA	1 (14,3)	0 (0)		0 (0)	1 (16,7)	
- SMD	3 (42,9)	1 (10)		1 (50)	0 (0)	
- OTROS (LNH/MM/MF)	2 (28,6)	6 (60)		0 (0)	4 (50)	
CD34 infundidas	2,89 (1,66-4,4)	5,6(4,5-5,8)	0,01	9,8 (1,4-9,8)	4,8 (3,5-6,2)	1
CD34 >5x10⁶/Kg infundidas	1(14,3)	7 (70)	0,2	1 (50)	3 (50)	1
<u>Estatus antes de TPH</u>						
1ª RC EMR-	1(14,3)	2 (20)	0,4	1(50)	2(33,3)	0,3
2ªRC EMR-	0	1 (10)		0	1(16,7)	
Enfermedad visible	6 (85,7)	7 (70)		1(50)	3 (50)	
<u>Tipo de TPH</u>						
HLA idéntico	2 (28,6)	3 (30)		0	4 (66,7)	
HLA idéntico no emparentado	2 (28,6)	1 (10)	0,4	2	1 (16,7)	0,1
SCU dual	1(14,3)	0		0	1 (16,7)	
Haploidéntico	2 (28,6)	6 (60)		0	0	
Donante mujer/ Receptor varón	6 (85,7)	5 (50)	0,3	2 (100)	4 (66,7)	0,1
<u>Fuente PH</u>						
SP	4 (57,1)	10 (100)		1 (50)	6 (100)	
MO	2 (28,6)	0	0,07	1 (50)	0	0,06
SCU	1 (14,3)	0		0	0	

	EICR aguda n=17		p	EICR crónica n=8		p
<u>Acondicionamiento</u>						
Mieloablativo	3 (42,9)	5 (50)	0,7	1 (50)	3 (50)	1
No mieloablativo	4 (57,1)	5 (50)		1 (50)	3 (50)	
<u>Acondicionamiento</u>						
BUX-FLU	2 (28,6)	5 (50)		1 (50)	2 (33,3)	
BUX-FLU-CFM	3 (42,9)	2 (20)	0,5	0	0	0,4
BUX-FLU-TIMOG	2 (28,6)	3 (30)		1 (50)	1 (16,7)	
OTROS	0	0		0	3 (50)	
<u>Grado clínico de EICR aguda</u>						
II	0	3 (100)	0,1	–	–	
III-IV	7 (50)	7 (50)	0,1	–	–	
<u>EICR aguda solo 1 órgano</u>						
Si	1(16,7)	6 (60)	0,9	–	–	
No	5 (83,3)	4 (40)		–	–	
<u>Grado clínico de EICR crónica</u>						
Moderado	–	–		0	5 (100)	0,03
Severo	–	–		2	1 (37,5)	
<u>Indicación FEC</u>						
EICR corticodependiente	2 (28,6)	3 (30)	0,9	1 (50)	6 (100)	0,06
EICR corticorefractaria	5 (71,4)	7 (70)		1 (50)	0	
Días entre dx de EICR e inicio de FEC	33	29,5	0,7	129	150	0,6
EICR muco-cutáneo	4 (57,1)	6 (60)	0,9	2	5(83,3)	0,5
<u>Línea tratamiento FEC</u>						
2ª	1 (14,3)	3 (30)	0,07	0	2 (33,3)	0,5
3ª	3 (42,9)	7 (70)		1 (50)	3 (50)	
4ª	3 (42,9)	0		1 (50)	1 (16,7)	

	EICR aguda n=17		p	EICR crónica n=8		p
Nº de procesos FEC	8	12,5	0,2	8,5	28,5	0,07
Duración en días de FEC	135	103	0,1	165	56	0,07
%Reducción de CT al final de FEC	30	100	0,07	50	100	0,4
Celularidad infundida (Media del total de procedimientos)						
CMNT x 10⁶/kg	29,1 (22,6-69,6)	58,6(13,2-75,3)	0,8	14,9(14,9-14,9)	85,6(52,6-124)	0,2
CMNT x10⁸	20,9 (11,7-36,6)	35,1(9,3-43,1)	1	7,7(7,7-7,7)	49,7(29,4-75,8)	2
CNTx10⁶/kg	52,1 (28,3-77,4)	69,2(20,7-79,3)	0,8	21,2(21,2-21,2)	96,3(67,8-130)	0,2
CNTx10⁸	31,9(19-40,1)	41,4(14,8-50,2)	0,6	11(11,04-11,04)	56,2(37,6-80,4)	0,2
CD3+CD4+x10⁸	1,8 (0,1-4,2)	3,32(1,5-10,4)	1	1,06(1,06-1,06)	7,8(5,2-18,9)	0,2
CD3+CD8+x10⁸	4,4 (0,4-13)	6,33(1,72-20)	0,7	1,11(1,11-1,11)	12,4(5,6-34,7)	0,2
CD19+x10⁸	0,2 (0,01-8)	0,4(0,01-2,1)	0,9	0,04(0,04-0,04)	3,4(1,9-8,7)	0,2
NK x10⁸	2,8 (0,9-5)	2,2(1,5-4,6)	0,3	3,4(3,4-3,4)	2,2(1,7-4,4)	0,5
Celularidad pre-aféresis del paciente						
Leucocitos x10⁹/L	5,5(2,9-7,8)	6,9(3,0-7,7)	0,6	0,5 (0,5-0,5)	9,41(8,5-10,7)	0,2
Linfocitos%	10,1 (3,1-69)	17,4(10,3-30,7))	0,7	2,8(2,8-2,8)	34,1(18,4-58,4)	0,2
Linfocitos x10⁹/L	0,6(0,7-4,2)	0,90 (0,1-1,1)	1	0,1(0,1-0,1)	3,1(2,1-5,7)	0,2
Monocitos%	8,6 (2,1-14,1)	11,3(5,5-18,7)	0,5	10,9(10,9-10,9)	6,6 (3,2-10,9)	0,5
Monocitos x10⁹/L	0,3 (0,1-0,6)	0,7 (0,2-1,2)	0,3	0,1(0,1-0,1)	0,6(0,2-1,1)	0,2
Hb (gr/dl)	9,5(9,1-11,2)	11,4(10,2-12,3)	0,1	10,5(10,5-10,5)	13,6(12,5-14,7)	0,2
Plaquetas	52(48,5-87)	114(91,5-165)	0,04	13 (13-13)	114(67-219)	0,2

EICR: enfermedad injerto contra receptor. **FEC:** fotoféresis extracorpórea. **LMA:** leucemia mieloide aguda. **LLA:** leucemia linfocítica aguda. **SMD:** síndrome mielodisplásico. **LNH:** linfoma no Hodgkin. **MM:** mieloma múltiple. **MF:** mielofibrosis. **TPH:** trasplante de progenitores hematopoyéticos. **EMC:** enfermedad mínima residual. **RC:** remisión completa. **DNE:** donante no emparentado. **SCU:** sangre cordón umbilical. **PH:** progenitores hematopoyéticos. **SP:** sangre periférica. **MO:** médula ósea. **BUX:** busulfán. **FLU:** fludarabina. **CFM:** ciclofosfamida. **TIMOG:** timoglobulina. **Csa:** ciclosporina A. **MTX:** metotrexate. **MM:** micofenolato de mofetilo. **CMN:** células mononucleadas, **CN:** células nucleadas

No encontramos ninguna diferencia significativa entre los respondedores y los no respondedores a FEC en ninguna de las variables analizadas, salvo en el grupo de **EICR aguda** en el que la menor edad ($p < 0,03$), la mayor celularidad CD34+ $\times 10^6$ /kg infundida ($p < 0,01$) y el mayor recuento de plaquetas pre-FEC se asociaron a respuesta. Tanto en la **EICR aguda** como en la **EICR crónica** la celularidad infundida de CMN y de SPL fue mayor en los que respondieron, aunque sin alcanzar significación estadística. No se objetivó esta diferencia en la EICR aguda. El menor recuento de plaquetas pre-aféresis se asoció a la no respuesta en ambos grupos. En el grupo de EICR aguda se aproximó a la significación.

7.3.7. Análisis de la toxicidad durante la FEC.

En todos los pacientes los procedimientos fueron bien tolerados y en ningún caso hubo que suspender el procedimiento. Los síntomas más frecuentes fueron los derivados de la hipocalcemia. Las parestesias en las manos y peribucal en 3 pacientes que cedieron con la administración de Calcio i.v, náuseas y sensación de malestar al inicio del proceso en un paciente, infección del catéter central en 1 paciente, que cedió tras tratamiento antibiótico. Otras complicaciones observadas durante el tratamiento con FEC: en 5 pacientes presentaron reactivación de CMV, en 3 pacientes se objetivó bacteriemia por *Staphylococcus epidermidis*, 2 pacientes presentaron bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa*, 1 paciente presentó IFI por *Aspergillus sp* y en otro una infección bronquial sin germen identificado.

7.3.8. Análisis de la supervivencia y muerte relacionada con trasplante.

Los datos de seguimiento y muerte relacionada con el trasplante se detallan en la **tabla 27**.

Tabla 27. Seguimiento y muerte relacionada con trasplante.

	EICR aguda	EICR crónica
	Mediana (RIQ)	Mediana (RIQ)
	n=16	n=8
Seguimiento desde TPH hasta éxitus o fin de seguimiento en meses	16 (10-21)	25 (19-42)
Seguimiento de EICR en meses	12 (6-17)	10 (9-20)
Seguimiento desde inicio de FEC hasta éxitus o final de seguimiento	7 (2-27)	9 (1-18)
Supervivencia global desde inicio FEC en meses	8 (3-16)	9 (4-15)
Causa de éxitus		
Vivo	7 (43,7%)	3 (37,5%)
Muerte por recaída	4 (25%)	1 (12,5%)
Muerte por EICR	5 (31,2%)	4 (50%)
Status global al final de seguimiento		
Vivo	7 (43,7%)	3 (37,5%)
Éxitus	9 (56,2%)	5 (62,5%)

La mediana de seguimiento de los pacientes fue desde el TPH, en EICR aguda 16 meses (10-21) y de la EICR crónica de 25 meses (19-42). El seguimiento de la EICR fue de 12 meses (6-17) en EICR aguda y de 10 meses (9-20) en la EICR crónica. La mediana de seguimiento desde el inicio de FEC hasta éxitus o final de seguimiento fue de 7 meses (2-27) y el seguimiento en EICR crónica fue de 9 meses (1-18).

Al final del seguimiento en el grupo de **EICR aguda**, 5 pacientes (31,2%) murieron de EICR (mortalidad relacionada con trasplante) y 4 (25%) por recaída de la enfermedad hematológica), 7 (43,7%) pacientes permanecían vivos.

En el grupo de **EICR crónica** 4 pacientes (50%) murieron de EICR. 1 paciente (16,7%) murió de progresión de la enfermedad hematológica. Al final del seguimiento 3 pacientes seguían vivos (37,5%).

Causas de muerte: En el grupo de pacientes con **EICR aguda** las causas de MRT fueron en 5 pacientes (31,25%): 1 distress respiratorio por *Pneumocystis jirovecii* y clínica de EICR, 1 encefalitis vírica BK+ (EICR digestivo), 1 por EICR hepático IV refractario y 1 por EICR digestivo IV refractario. Las muertes por otra causa se produjeron en 4 pacientes (25%) por progresión de su enfermedad hematológica de base. Las causas de muerte en el grupo de **EICR crónica** fueron 2 pacientes por insuficiencia respiratoria severa secundaria a EICR pulmonar, 1 paciente por Shock séptico por *Escherichia coli* junto con EICR cutáneo activo y 1 paciente por progresión de la enfermedad hematológica de base.

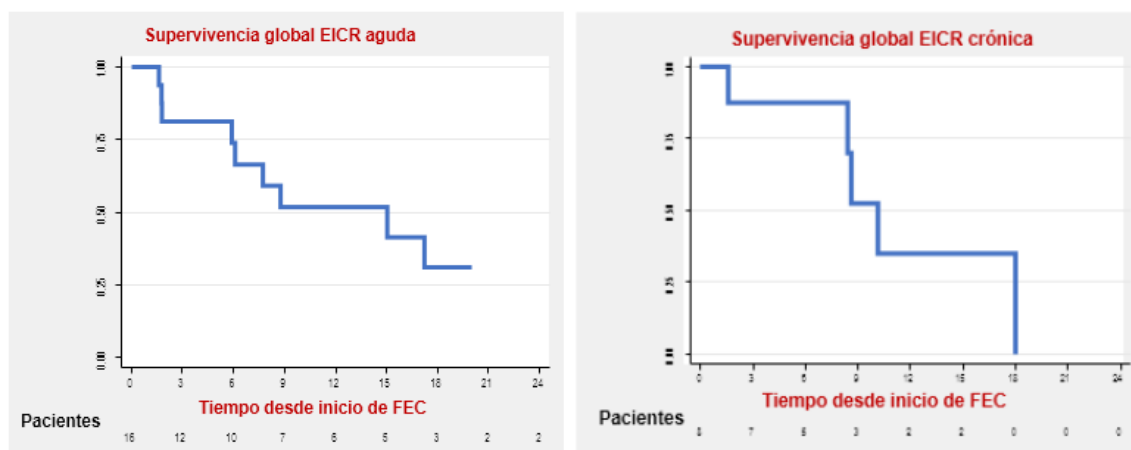
Al final del seguimiento, la muerte no relacionada con el Trasplante (recidiva de la enfermedad hematológica): En el grupo de EICR aguda fueron 4 pacientes y en el grupo de EICR crónica fue 1 paciente.

7.3.8.1. Resultados de supervivencia

7.3.8.1.1. Supervivencia global desde el inicio de tratamiento con FEC:

La supervivencia global estimada de los pacientes analizados con **EICR aguda** a los 6 meses fue del 73% (IC95%:44%-89%) desde el inicio del tratamiento con FEC (Figura14). La supervivencia global de los pacientes analizados con **EICR crónica**, desde el inicio del tratamiento con FEC, a los 6 meses fue del 87% (IC95%:38%-98%). (Figura 14)

Fig 14. Supervivencia global desde el inicio de FEC en EICR aguda y EICR crónica.

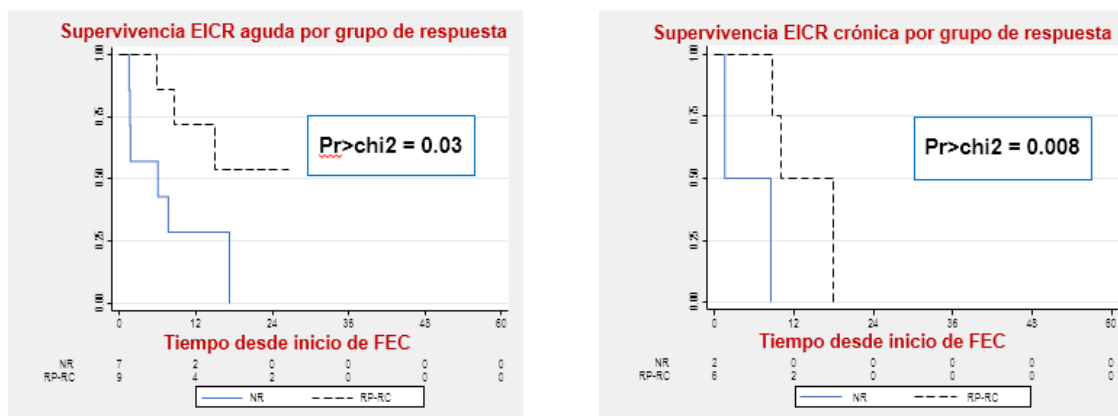


7.3.8.1.2. Supervivencia global en EICR desde inicio de FEC por grupo de respuesta

En el grupo de **EICR aguda**, durante el periodo de estudio, hubo 5 muertes por EICR entre los pacientes que no respondieron a FEC y ninguno en los que respondieron. 5 pacientes murieron por otras causas (4 en el grupo de respuesta, que murieron por progresión de la enfermedad). ($P > \chi^2 = 0,03$.) (Figura 15).

En el grupo de **EICR crónica**, 4 pacientes murieron de EICR (2 en el grupo de respuesta y 2 en el grupo de no respuesta) y 1 con respuesta que murió de progresión de la enfermedad ($P > \chi^2 = 0,008$.) (Figura 15).

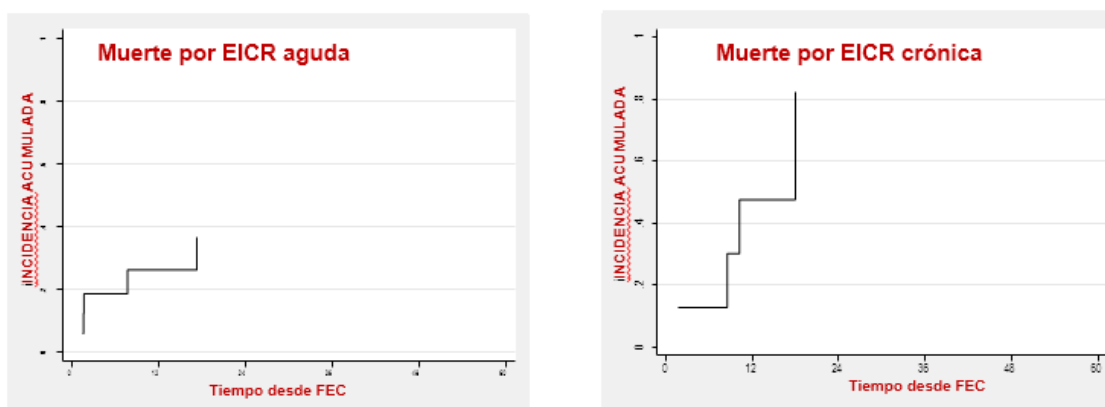
Figura 15. Supervivencia por grupo de respuesta en EICR aguda y EICR crónica



7.3.8.2. Incidencia acumulada de muerte por EICR

La incidencia acumulada de muerte por **EICR aguda** a los 8 meses fue del 26% (IC 95%: 0,8%-49%). La incidencia acumulada de muerte por **EICR crónica** a los 8 meses fue del 30% (3%-63%) a los 10 meses del 45% (IC 95%:9-78%). (Figura 16)

Figura 16. Incidencia acumulada de muerte por EICR

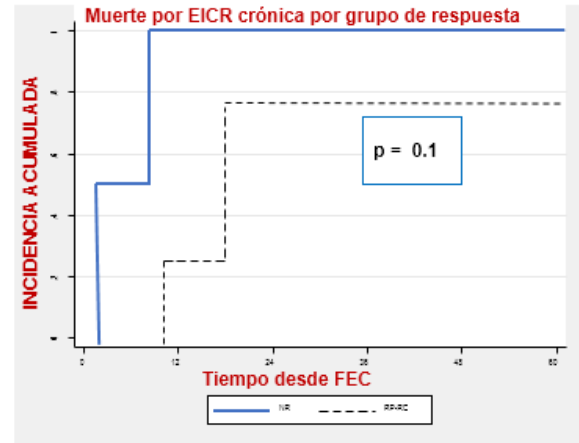
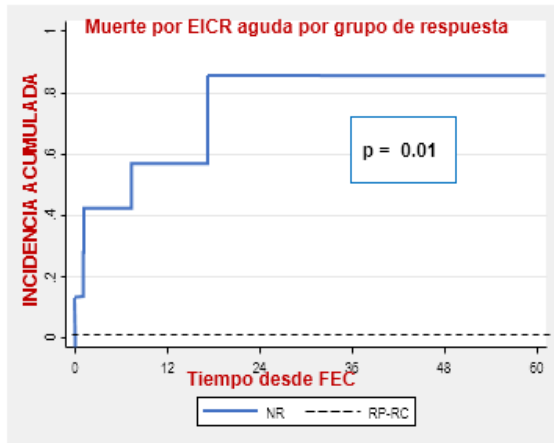


7.3.8.3. Incidencia acumulada de muerte por EICR por tipo de respuesta.

De los 16 pacientes analizados que presentaron **EICR aguda**, 7 no respondieron al tratamiento y de ellos 5 murieron por EICR aguda, a los 1,6, 1,7, 1,8, 7,7 y 17,2 meses respectivamente. (Figura 17)

De los 8 pacientes que presentaron **EICR crónica**, 2 no respondieron al tratamiento y fallecieron los 1,6 y 8,4 meses respectivamente (Figura17)

Figura 17. Incidencia acumulada de muerte por EICR por tipo de respuesta



Discusión

8. DISCUSIÓN

El TPH alogénico es la única opción curativa en muchos de los pacientes con enfermedades hematológicas malignas.⁴⁷ Sin embargo la EICR es una de las complicaciones con mayor morbi-mortalidad que se produce en el periodo postrasplante y que afecta hasta a un 40-60% de los pacientes.²⁵ El tratamiento de primera línea es CT a altas dosis pero solo responden un 40–50% confiriendo mucha toxicidad. Los tratamientos de segunda línea en la EICR no están bien definidos con resultados sub-óptimos siendo este el principal problema en este tipo de trasplante. La FEC ha demostrado ser eficaz y segura en el tratamiento de la EICR aguda y crónica refractarias sobre todo con afectación muco-cutánea y ha permitido en muchos casos reducir o suspender el tratamiento con CT.^{118,125} Además los pacientes respondedores presentaron una mayor supervivencia.¹¹⁷ Estos resultados han hecho que las guías de FEC incluyan la EICR aguda y crónica entre sus indicaciones con alto nivel de evidencia.^{81,108} Sin embargo existen algunas incógnitas en esta terapia, como son el mecanismo exacto de acción, la identificación de la célula principal efectora contenida en el producto infundido y si existe algún factor clínico o biológico determinante de la respuesta.¹³⁶

1. Análisis global de la celularidad pre-aféresis, post-aféresis, del producto infundido y características de colecta.

En nuestro estudio, de diseño retrospectivo, las diferencias más importantes entre los valores pre-aféresis y post-aféresis de los pacientes fueron la Hb y el recuento de plaquetas, siendo menores en la determinación post-aféresis. La media de pérdida de Hb y de plaquetas fue de 1,36 gr/L y de $36 \times 10^9/L$, respectivamente.

La pérdida de Hb y plaquetas en el proceso de colecta de CMN ya ha sido previamente descrita por otros autores.^{137–140}

En nuestro estudio los recuentos post-aféresis se realizaron inmediatamente después de finalizar el procedimiento de colecta, lo que pudo artefactar el resultado por hemodilución de la muestra. En nuestro estudio este hallazgo no tuvo ninguna repercusión clínica y no fue necesario la transfusión de hemoderivados en ningún caso.

En el análisis global de la celularidad contenida en el producto, se obtuvo una celularidad media de CMN óptima de $61,6 \times 10^6/\text{kg}$ (RIQ: 18,1-86,2) por procedimiento, dato similar a lo descrito por otros autores.^{137,139} *Perseguin et al*¹³⁶ sugieren que el valor óptimo de CMN colectado en la FEC debe ser de al menos $100 \times 10^6/\text{kg}$ por cada ciclo de dos procedimientos.¹³⁷ En nuestro estudio, la celularidad obtenida en términos de CMN fue superior a la descrita por otros autores utilizando el sistema cerrado “on line” de Terakos®.¹⁴¹

En nuestro estudio, el grado de pureza de la colecta fue del 81%, valor muy elevado y similar al descrito por otros autores.^{127,137,138} La contaminación por Hb fue muy baja, y los valores obtenidos de Hto estuvieron muy por debajo de los recomendados como óptimos para una adecuada irradiación.⁷⁰

En el análisis global la eficiencia media de colecta de CNT, de CMNT y la pérdida plaquetaria en porcentaje fueron de **13,9%**, **28,7%** y **27,5%**, respectivamente, valores comparables a los comunicados en estudios previos por autores que utilizaron la misma técnica de FEC.^{127,137,138}

2. Estudio de comparación entre los dos dispositivos de colecta Cobe Spectra® y Spectra Optia®.

Con el fin de comparar la eficiencia de los dos dispositivos de colecta de CNM utilizados en nuestra institución, realizamos un análisis comparativo de 63 procedimientos realizados en Cobe Spectra® y 51 en Optia Spectra®. Cuando se utiliza la técnica “off line”, la colecta de CMN es clave en la FEC y para ello se requiere de dispositivos de colecta de alta eficacia y lo más automáticos posibles, por lo que los esfuerzos actuales

está enfocados en conseguir dispositivos más eficientes y fáciles de uso. En este sentido, el dispositivo Optia Spectra® es el que tiene un mayor nivel de automatización de los dos. En cuanto a su rendimiento, tanto el volumen procesado, como el volumen final del producto y la cantidad de ACD usado en las colectas fueron significativamente menores en el grupo Optia®. La contaminación con hematíes fue mayor en el grupo Optia®, obteniendo valores más altos de Hb y de Hct aunque sin superar los valores establecidos como óptimos para el proceso de irradiación de Hct⁷⁰. El recuento de CMNT fue similar con ambos dispositivos. Como dato más destacable, la eficiencia de colecta de las CMNT fue mucho mejor en el grupo Optia® (Cobe=18,3% vs Optia=33,1%). Los valores de linfocitos pre-aféresis fueron más bajos en el grupo Optia, lo que explica que con mayor eficiencia de colecta el recuento de CMN fuera semejante en ambos grupos.

En cuanto a la pérdida de plaquetas, fue mucho menor en el grupo Optia® (Cobe=35,6% vs Optia=20,9%). Este hallazgo es muy importante, dado que es habitual que los pacientes con EICR (especialmente con EICR aguda) inicien este tratamiento con recuentos de plaquetas bajos, por lo que la utilización de dispositivos con baja pérdida de plaquetas nos ayudará en el manejo de estos pacientes, reduciendo el riesgo de complicaciones hemorrágicas. Otro aspecto favorable de cara al manejo de los pacientes fue la menor utilización de ACD en el grupo Optia®, lo que se traduce en un menor riesgo de aparición de síntomas de hipocalcemia durante el proceso de colecta de CMN.

En un estudio similar realizado por *Fante et al*³⁸ que comparó la FEC sistema “off line” utilizando ambos dispositivos Cobe Spectra® y Spectra Optia®, éstos autores no objetivaron diferencias entre ambos dispositivos en cuanto a la eficiencia de CMN ni a la pérdida de plaquetas. La contaminación de Hb fue a diferencia de nuestro estudio, más baja en el grupo Optia®. *Perseguin et al*²⁶ compararon el dispositivo Cobe Spectra® y el dispositivo Amicus Crescendo Fenwal® en la colecta de CMN en FEC

sistema “*off line*” no encontrando diferencias en la eficiencia de colecta de CMN. La pérdida plaquetaria fue mayor en el grupo de Cobe Spectra® y no hubo diferencias en la contaminación de hematíes. Hay pocos estudios publicados hasta la fecha que comparan diferentes sistemas en colecta de CNM en FEC, con resultados diversos, y de difícil interpretación, por incluir algunos de ellos poblaciones heterogéneas, y por utilizar dispositivos semiautomáticos en cuya reproducibilidad puede influir la formación y experiencia del personal técnico que lo maneja.

3. Análisis de la correlación entre la celularidad (linfocitos, monocitos) pre-aféresis y la del producto.

El coeficiente de correlación global entre los recuentos celulares pre-aféresis y el del contenido en el producto fue para los leucocitos, linfocitos y monocitos de 0,25, **0,44** y **0,57** respectivamente, consideradas como una correlación *positiva moderada*. Todos los valores resultaron estadísticamente significativos con una $p < 0,01$.

La correlación de linfocitos y monocitos entre los recuentos pre-aféresis y el contenido en el producto fue más estable con el dispositivo más moderno y automático Spectra Optia®. El coeficiente de correlación dependiendo del dispositivo y de los leucocitos pre-aféresis fue variable y en general no hubo una disminución del CR con mayor número de leucocitos, como se podría esperar de forma similar a lo que ocurre en la colecta de CD34 en el TPH.^{142,143}

*Liu et al*¹⁴⁴ estudiaron la correlación de la celularidad pre-aféresis y del producto en un grupo de pacientes con EICR post-TPH y rechazo post-trasplante de pulmón tratados con FEC sistema “*on line*”. Encontraron una correlación fuerte tanto en los linfocitos (0,85) como en monocitos (0,74), comparables a nuestros resultados, aunque con valores superiores; la correlación de leucocitos fue débil, de 0.26, inferior a nuestros resultados. *Liu et al*¹⁴⁴ también compararon 2 dispositivos de colecta del sistema “*on line*” de Terakos®, obteniendo mejores correlaciones de los recuentos celulares con el

dispositivo más moderno, Cellex Terakos®, lo que sugiere que los nuevos dispositivos automáticos consiguen mejores rendimientos de colecta.

Las diferencias de resultados encontradas entre nuestro estudio y el de *Liu et al*¹⁴⁴ podrían justificarse por el número de procedimientos analizados (mucho menor que el nuestro), por el tipo de pacientes estudiados y por el diferente sistema de FEC. *Liu et al*¹⁴⁴ solo incluyeron pacientes con EICR crónica, además de pacientes con rechazo de trasplante pulmonar que desde el punto de vista clínico pueden encontrarse en mejor estado y de alguna manera permiten una colecta más estable. Se necesitan más estudios en esta línea para poder establecer si las correlaciones entre los recuentos celulares pre-aféresis y los contenidos en los productos son mejores con uno de los dos sistemas.

En la actualidad, en las guías de manejo en FEC se aconseja no iniciar este tratamiento si los leucocitos pre-aféresis son menor de $1 \times 10^9/L$. En nuestro estudio no fijamos ningún recuento mínimo celular antes de iniciar FEC aunque hubo algunos procedimientos que se realizaron con menos de $0,2 \times 10^9/L$, linfocitos pre-aféresis, concretamente 8, valor mínimo que estableció *Peroti et al* como eficaz. En nuestro estudio, estos pacientes con menos de $0,2 \times 10^9/L$ la colecta no fue óptima obteniéndose una mediana de celularidad en términos de CMNT de $9,2 \times 10^6/Kg$ y en los procedimientos con $0,2 \times 10^9/L$, la mediana de CMNT colectadas fue de $9,1 \times 10^6/Kg$ ^{136,140} observación que apoya la idea de establecer un mínimo de recuento linfocitario pre-aféresis. Con los datos obtenidos de enriquecimiento del producto en linfocitos y monocitos en nuestro estudio y en el de *Liu et al*¹⁴⁴ no podemos establecer un recuento mínimo de leucocitos antes de iniciar FEC.^{115,136,144}

En base a los valores obtenidos en nuestro estudio, se podrían individualizar los procedimientos a realizar en cada paciente sometido a FEC sistema “off line” en tiempo

y volemias según los recuentos celulares de leucocitos, linfocitos y monocitos determinados pre-aféresis.

4. Análisis de las subpoblaciones linfocitarias en el producto y su correlación con las SPL pre-aféresis.

En el análisis global que se realizó de la celularidad del producto en términos de SPL CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+ y NK se observó que presentaron valores variables, con una población linfocitaria T mayoritaria con predominio de linfocitos CD3+CD8+. Se observó un coeficiente de correlación muy elevado entre las concentraciones de las SPL CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+ y NK pre-aféresis y productos infundidos, CR= 0,69, 0,78, 0,79, 0,90, 0,43 respectivamente. Los CR de las SPL fueron mejores que con los obtenidos en los recuentos de linfocitos y monocitos y fueron superiores con menor recuento leucocitario. El CR fue superior para todas las SPL con recuentos de leucocitos pre-aféresis $<2,5 \times 10^9/L$, y no se modificaron con recuentos leucocitarios pre-aféresis muy bajos de $<1,5 \times 10^9/L$, si bien el número de procedimientos con leucocitos pre-aféresis de $<1,5 \times 10^9/L$ fue de solo 16. En el caso de demostrarse una asociación entre la dosis de SPL infundidas y la respuesta clínica se podría predecir la dosis linfocitaria obtenida tras la aféresis a partir de los recuentos de SPL pre-aféresis del paciente con más precisión que con los recuentos de leucocitos, linfocitos y monocitos. Hasta la fecha no se ha comunicado en la literatura ningún estudio similar que analice el contenido de SPL en el producto a infundir y su correlación con los valores pre-aféresis.

5. Análisis de la reconstitución inmune al finalizar el tratamiento con FEC.

En el análisis de la evolución de las SPL desde el inicio de la FEC hasta la suspensión del tratamiento se objetivó una mejoría en la inversión del ratio CD4/CD8; la SPL CD3+CD4+ aumentó dos veces desde el valor inicial evaluado, y la SPL CD3+CD8+ aumentó 1,5 veces. Las SPL CD19+ y NK experimentaron un ligero aumento al final del

tratamiento con FEC. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Tampoco encontramos diferencias entre los pacientes respondedores y no respondedores a FEC, ni diferencias entre los pacientes con EICR aguda y crónica, que podría explicarse por el bajo número de pacientes analizados. Varios autores realizaron un análisis similar encontrando que tras la FEC aumentó el ratio CD4/CD8, lo que se relacionó con la respuesta clínica a FEC tanto en pacientes adultos como pediátricos.^{105-107,145} *González et al*¹⁴⁵ encontraron resultados similares a los nuestros en un estudio realizado en pacientes pediátricos con EICR tratados con FEC sistema off-line. *Yamashita et al*¹⁰⁵, estudiaron los cambios de SPL en la EICR crónica y objetivaron por primera vez que las SPL CD3+CD4+ y CD3+CD8+ se normalizaron tras la FEC. En este sentido *Tsirigotis et al*¹⁰⁶ estudiaron cómo la FEC modulaba las SPL en pacientes con EICR crónica y además lo relacionaron con la respuesta a FEC. Los respondedores tuvieron unos recuentos mayores de CD3+CD4+ y CD3+CD8+ en comparación con los no respondedores, apoyando estos hallazgos el concepto de que la FEC no es inmunosupresora. *Lorenz et al*¹⁰⁷ estudiaron los cambios de las SPL en relación a la respuesta clínica en un paciente con EICR aguda y en un paciente con BOS post-trasplante de pulmón, objetivando un aumento de la población CD3+CD4+Tregs y una disminución de los linfocitos CD3+CD8+ (efectoras de memoria) y de las NK en los respondedores. Estos hallazgos, además de ayudar a comprender cómo actúa la FEC, nos podrían ayudar a monitorizar la respuesta clínica a FEC en estos pacientes.

6. Análisis de la respuesta clínica a la FEC.

Se analizó la respuesta clínica a la FEC separando los pacientes por tipo de EICR: EICR aguda y EICR crónica. En nuestra cohorte, las respuestas globales a la FEC al final del tratamiento fueron en la EICR aguda de 59% (RC= 47%, RP= 11%, NR=41%). En la EICR crónica, la respuesta global fue de 75% (RC= 38%, RP= 37%, NR= 25%).

Las tasas de respuesta a la FEC por órganos fue de un 73% en la EICR aguda cutánea, 67% en la EICR aguda intestinal (RC=34%, RP= 33%) y del 34% en el EICR aguda hepática. En la EICR crónica, la respuesta global a la EICR muco-cutánea fue del 80% (RC=51%, RP= 29%). En la EICR crónica intestinal la respuesta fue del 100% (solo un paciente presentó esta sintomatología). En la EICR hepática la respuesta global fue del 67% (RC= 33%, RP= 34%). En la EICR crónica pulmonar hubo 2 respuestas parciales (67%).

Las respuestas globales de la EICR aguda y EICR crónica refractarias al tratamiento con CT a la FEC comunicadas por distintos grupos en la literatura han sido variables, siendo en general mejor la respuesta de la EICR cutánea, al igual que se observó en nuestra serie. En un estudio donde utilizaron la misma técnica de FEC que nosotros¹²¹, se obtuvo una respuesta en la EICR aguda cutánea del 75% (RIQ:50–100%), en la afectación intestinal del 58% (RIQ :0–100%) y en la EICR aguda hepática de 47% (RIQ: 0-100%).¹²² En la EICR crónica se objetivó una resolución global completa y parcial de alrededor del 65%, con mejor respuesta en la afectación cutánea. Nuestros resultados estuvieron en la línea de los publicados por otros autores.^{119–121}

El tratamiento con FEC permitió de forma muy importante la disminución y suspensión del tratamiento con CT al final del tratamiento. En nuestro estudio encontramos al final del tratamiento con FEC una reducción del 90% en el tratamiento con CT en el grupo de EICR aguda y de un 100% en el grupo de EICR crónica. En el grupo de EICR aguda a los 8 días (RIQ:1-30) de iniciar FEC se pudo iniciar la reducción de CT y a los 25 días (RIQ:10-69) en el grupo de EICR crónica. *Peroti et al* y *Greinix et al* además comprobaron que la disminución de la dosis de esteroides se asoció a un aumento de la supervivencia.^{118,140} En nuestro análisis la reducción de esteroides de los pacientes que no respondieron a FEC fue menor en los 2 grupos, un 30% en la EICR aguda y un 50% en la EICR crónica frente a un 100% en los pacientes que respondieron a FEC tanto en

EICR aguda e EICR crónica, observación encontrada en varios estudios, siendo ésta una de las más importantes ventajas de la FEC.^{118,122,125,140}

7. Análisis de los factores asociados a respuesta a FEC

Hasta la fecha no se ha establecido ninguna variable clínica ni de laboratorio predictora de respuesta al tratamiento con FEC en la EICR.^{127,137,140}

En nuestro estudio encontramos tres variables asociadas de forma significativa a respuesta a FEC: en el grupo de EICR aguda, la edad de los pacientes y el recuento de plaquetas pre-aféresis (los pacientes más jóvenes y con recuento de plaquetas mayor respondieron mejor a la FEC); en el grupo de EICR crónica, el grado de EICR NIH moderado se asoció a un 100% de respuestas. Datos similares fueron comunicadas por *Berger et al.*¹²⁷

No encontramos asociación entre la respuesta a la FEC y el intervalo de tiempo entre el diagnóstico de EICR y el inicio de FEC. Varios centros trasplantadores aplican este tratamiento muy temprano y siempre en segunda línea debido al perfil favorable de este tratamiento comparada con otras opciones.^{117,123} En nuestro estudio utilizamos la FEC en segunda línea solo en 4 (23,5%) en EICR aguda y en dos (25%) en EICR crónica. Es de suponer que si utilizáramos estrictamente la FEC en segunda línea las tasas de respuesta podrían mejorar, ya que las alteraciones producidas por la EICR cuando el daño de órgano se ha establecido son muy difíciles de revertir.^{114,117,118}

Hay pocos estudios que relacionen la celularidad infundida y la respuesta clínica a la FEC. *Perseguin et al*¹³⁷ estudiaron la relación entre la dosis de CMN infundida en la FEC sistema abierto "on-line" y la probabilidad de respuesta en pacientes con EICR crónica. Fueron identificadas dos variables asociadas a respuesta, pero sin alcanzar significación estadística: el intervalo de tiempo desde el diagnóstico de EICR y el inicio de la FEC, y la dosis de CMN infundida. En su estudio, una dosis de CMN infundida de $100 \times 10^6/\text{kg}$ por ciclo de FEC producía mejores respuestas. Esta celularidad ha quedado

establecida como un valor óptimo a conseguir en la colecta de CMN en el tratamiento de FEC. *Berger et al*¹²⁷, en una reciente publicación, utilizando FEC sistema “on-line” estudiaron la asociación entre la celularidad infundida y respuesta, sin encontrar diferencias significativas. *Peroti et al*¹⁴⁰ en un estudio en pacientes pediátricos tampoco encontró asociación de la celularidad infundida con la respuesta a FEC. Nuestro estudio mostró datos semejantes a los estudios publicados. Se objetivó una mayor celularidad global infundida en los respondedores a FEC, aunque ningún valor alcanzó la significación estadística. En la media de la celularidad infundida, en términos de CMNT y SPL, infundida de todos los procedimientos, todos los valores fueron mayores en los respondedores, tanto en el grupo de EICR aguda como EICR crónica. En todas las variables de celularidad infundida, los valores más altos fueron en los pacientes con EICR crónica, también acorde con los datos publicados.^{127,137} Todos estos estudios están ayudando a consolidar la idea de que una mayor celularidad infundida en términos de CMN está relacionado con mejor respuesta.

El quimerismo analizado al final del tratamiento no se modificó en ningún caso. Los pacientes que presentaron quimerismos mixtos al final del tratamiento también lo tuvieron al inicio, dato que apoya la idea de que la FEC no favorece la progresión de la enfermedad hematológica de base.^{82,115}

El tratamiento fue bien tolerado en todos los pacientes, no encontrando ningún efecto adverso serio. Solo en dos pacientes se produjo anemia atribuible al procedimiento. Un paciente presentó dos episodios de infección del CVC por *Staphylococcus epidermidis* que respondió al tratamiento antibiótico. Esta baja tasa de complicaciones también ha sido comunicada por otros autores.^{68,82,100,115}

En nuestra serie, se implantó un CVC tipo *Hickman* en todos los casos para facilitar el tratamiento con FEC. Otros autores han empleado reservorios tunelizados tipo Port-a-Cath® o incluso accesos venosos periféricos, sin complicaciones.^{138,146}

8. Análisis de la supervivencia

La mediana de seguimiento de los pacientes desde el TPH hasta el fallecimiento o el final de seguimiento fue de 16 meses (RIQ 10-21) en la EICR aguda y de 25 meses (RIQ 19-42) en la EICR crónica. La mediana de seguimiento del EICR fue de 12 (RIQ 6-17) en la EICR aguda y de 10 meses (RIQ 9-20) en la EICR crónica. La supervivencia global desde el inicio de FEC fue de 8 meses (RIQ 2,6-15,6) en la EICR aguda y de 9 meses (RIQ 4-15) en la EICR crónica. La situación al final de seguimiento fue de 7 (44%) vivos en la EICR aguda, y 3 (38%) vivos en la EICR crónica.

Al final del seguimiento en el grupo de **EICR aguda**, 5 pacientes (31%) murieron de EICR (mortalidad relacionada con trasplante) y 4 (25%) de recaída (progresión de la enfermedad hematológica). Al final del seguimiento 7 pacientes seguían vivos (44%) En el grupo de **EICR crónica** 4 pacientes (50%) murieron de EICR. Un paciente (17%) murió de progresión de la enfermedad hematológica. Al final del seguimiento 3 pacientes seguían vivos (38%).

Los pacientes que respondieron al tratamiento con FEC presentaron mayor supervivencia. La supervivencia global a los 12 meses fue en el grupo de EICR aguda fue de un 51% (IC95% 24-73%), y en la EICR crónica de 35% (IC95% 4-63%). *Hautmann et al*¹²¹ en un estudio retrospectivo comunicaron unos resultados algo peores que los nuestros en cuanto a supervivencia al final del seguimiento, con una mortalidad del 70% en el grupo de EICR a y del 44% en el grupo de EICR crónica, si bien el seguimiento de este estudio fue de 10 años.¹²²

9. Bondades y limitaciones

Este estudio nos ha permitido profundizar en el análisis biológico del contenido celular del producto infundido en el tratamiento de FEC sistema “*off-line*” pudiendo afirmar que estamos en el camino de alcanzar la individualización del tratamiento con FEC. Nuestros datos permiten calcular con precisión el tiempo de colecta y volemias a

realizar según los recuentos celulares de leucocitos linfocitos y monocitos pre-aféresis para conseguir una cantidad óptima de CMN con la intención de alcanzar la máxima probabilidad de respuesta.

En cuanto a las limitaciones del estudio, en primer lugar, nos hemos centrado en aspectos biológicos más que clínicos. Por dificultades técnicas se han perdido algunos datos que explican que el tamaño de la muestra en el estudio de SPL sea menor que el de la celularidad en términos de CMNT. No hemos realizado estudios de LT-regs, SPL fundamental que aumenta como consecuencia del tratamiento de FEC. Tampoco hemos realizado estudios de funcionalidad de monocitos ni de apoptosis. El tamaño de la población muestral y el relativamente corto tiempo de seguimiento de la EICR nos ha dificultado encontrar significación estadística.

El estudio de celularidad en FEC sistema *off-line* para el tratamiento de EICR aguda y crónica refractaria ha sido muy profundo y nos ha ayudado a comprobar algunos conceptos ya comunicados por otros autores y a conocer algunos menos estudiados como son la correlación de las SPL entre los valores pre-aféresis y las contenidas en el producto a infundir. Hemos comprobado la eficacia del nuevo dispositivo de colecta Spectra Optia. Hasta la fecha no se ha comunicado ningún estudio tan completo de estas características del tratamiento de FEC sistema "*off-line*" en pacientes adultos.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. La celularidad en términos de CMN y SPL del producto obtenido de la colecta en la FEC se puede estimar con alta precisión con la realización de un Hemograma y la determinación de las subpoblaciones linfocitarias en el paciente. La determinación de las subpoblaciones linfocitarias en el paciente pre-aféresis estima con mayor precisión el contenido celular que la determinación de los recuentos de linfocitos y monocitos.
2. El nuevo dispositivo de colecta automático Spectra Optia® es superior en la eficiencia de colecta de CMN y en la pérdida plaquetaria que el dispositivo Cobe Spectra®.
3. Con las limitaciones que presenta un estudio retrospectivo de una muestra de tamaño moderado y heterogénea donde se incluyeron pacientes desde el inicio de la implantación de la nueva terapia, podemos concluir que los resultados globales de respuesta clínica a la FEC han sido aceptables y comparables a la literatura publicada.
4. La reducción del tratamiento con CT fue una observación generalizada en todos los pacientes. Los pacientes que respondieron tratamiento con FEC se les pudo suspender el 100% del tratamiento con CT y en un 50% los no respondedores.
5. La Fotoféresis Extracorpórea realizada mediante el sistema abierto “*off-line*” para el tratamiento de la EICR refractaria es una terapia muy bien tolerada con escasos efectos adversos y que se puede realizar de forma adecuada y con calidad en una Unidad de Aféresis de un Hospital Terciario.

10. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1. Nuevas denominaciones de la EICR aguda y crónica.

Tabla 2. Factores de riesgo para desarrollar EICR aguda.

Tabla 3. Gradación clínica de la EICR aguda (*Gluskber et al*⁶⁹).

Tabla 4. Factores de riesgo para el desarrollo de la EICR crónica.

Tabla 5. Valoración global de la gravedad de la EICR crónica según NIH.³²

Tabla 6. Indicaciones clínicas de la ASFA para el tratamiento con FEC.

Tabla 7. Fórmulas de parámetros de colecta.

Tabla 8. Características clínicas de los pacientes.

Tabla 9. Valores pre-aféresis y post-aféresis de los pacientes en todos los procedimientos.

Tabla 10. Características y resultados de la celularidad de los productos de aféresis realizados en todos los pacientes independiente y dependiendo del dispositivo utilizado.

Tabla 11. Correlaciones entre la celularidad pre-aféresis y la contenida en el producto independiente y dependiendo del dispositivo utilizado.

Tabla 12. Correlación dependiendo del recuento de leucocitos pre-aféresis (<2,5, 2,5-7,5, >7,5 $\times 10^9/L$) en dispositivo Cobe Spectra®.

Tabla 13. Correlación dependiendo del recuento de leucocitos pre-(<2,5, 2,5-7,5, >7,5 $\times 10^9/L$) en dispositivo Spectra Optia®.

Tabla 14. Recuentos en sangre periférica antes y después del proceso de leucoaféresis con Cobe Spectra® y Spectra Optia® en pacientes en tratamiento con FEC.

Tabla 15. Celularidad y eficiencia de colecta de los productos de aféresis realizados con los dispositivos Cobe Spectra® y Spectra Optia®.

Tabla 16. Descriptivo de frecuencias de subpoblaciones linfocitarias pre-aféresis en el paciente y en el producto.

Tabla 17. Valores absolutos de las subpoblaciones linfocitarias contenido en el producto y rendimiento en la colecta.

Tabla 18. Correlación entre las subpoblaciones linfocitarias pre-aféresis y con los contenidos en el producto dependiendo del recuento leucocitario pre-aféresis.

Tabla 19. Valores de SPL antes del inicio de FEC y al final del tratamiento.

Tabla 20. Características de EICR (afectación por órganos).

Tabla 21. Características de la FEC y tratamiento inmunosupresor concomitante.

Tabla 22. Celularidad de los pacientes pre-aféresis.

Tabla 23. Celularidad infundida a los pacientes tratados con FEC.

Tabla 24. Respuestas globales al tratamiento FEC.

Tabla 25. Respuesta por órganos a la FEC.

Tabla 26. Asociación a la respuesta a FEC según las características de cada paciente.

Tabla 27. Seguimiento y muerte relacionada con trasplante.

FIGURAS

Figura 1. Número de TPH hematopoyéticos en España, según fuentes de la ONT 1994-2013.

Figura 2. Fases de la fisiopatología de la EICR aguda.

Figura 3. Pasos de la FEC con sistema “*off-line*”.

Figura 4. Estructuras moleculares: 8-MOOP y 8-MOOP unido a 2 bases pirimidínicas.

Figura 5. Modo de acción del 8-MOOP con la irradiación UVA.

Figura 6: Modelo de mecanismo de acción de la FEC en EICR.

Figura 7. Propuesta de mecanismo de acción de la FEC.

Figura 8. Dispositivos de colecta de MNC: Cobe Spectra® y Spectra Optia®, BCT-Terumo .

Figura 9. Protocolo de tratamiento FEC realizado en nuestra unidad.

Figura 10. Esquema de recogida de muestras para el estudio.

Figura 11. Esquema global de resultados.

Figura 12. Representación gráfica de la correlación de las SPL independiente del recuento de leucocitos pre-aféresis.

Figura 13. Representación gráfica de la correlación de las SPL independiente del recuento de leucocitos pre-aféresis.

Figura 14. Representación gráfica de la evolución de las SPL al inicio y al finalizar la FEC.

Figura 15. Supervivencia global desde el inicio de FEC en EICR aguda y EICR crónica.

Figura 16. Supervivencia por grupo de respuesta en EICR aguda y EICR crónica.

Figura 17. Incidencia acumulada de muerte por EICR.

Figura 18. Incidencia acumulada de muerte por EICR por tipo de respuesta.

BIBLIOGRAFÍA

11. BIBLIOGRAFÍA

1. J. Apperley, E. Carreras, E. Gluckman, T. Masszi. EBMT-ESH handbook. (2012). at <<http://www.ebmt.org/Contents/Resources/Library/EBMTESHhandbook/Pages/EBMT-ESH-handbook.aspx>>
2. McCulloch, E. A. Stem cells in normal and leukemic hemopoiesis (Henry Stratton Lecture, 1982). *Blood* **62**, 1–13 (1983).
3. Thomas ED, Blume KG, Forman SJ. *Hematopoietic Cell Transplantation. 2nd ed. Malden: Blackwell Science 2nd ed.* (1999).
4. Thomas, E. D., Lochte, H. L., Lu, W. C. & Ferrebee, J. W. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* **257**, 491–496 (1957).
5. Memoria ONT 2013. at <<http://www.ont.es/infesp/Memorias/Forms/AllItems.aspx>>
6. Huang, S. & Terstappen, L. W. Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* **360**, 745–749 (1992).
7. Korbling M, Fliedner TM. *Blood Stem Cell Transplants.* (Cambridge: Cambridge University Press, 1994).
8. Broxmeyer, H. E. *et al.* Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 3828–3832 (1989).
9. Fockner C. *Leukemia and allied disorders.* (NY;Mcmillan, 1938).
10. Jacobson, L. O., Simmons, E. L., Marks, E. K. & Eldredge, J. H. Recovery from radiation injury. *Science* **113**, 510–511 (1951).
11. Lorenz, E., Uphoff, D., Reid, T. R. & Shelton, E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J. Natl. Cancer Inst.* **12**, 197–201 (1951).
12. Barnes D, Loutit JF. What is the recovery factor in the spleen?. *Nucleonics* **12**: 68. Barnes D, Loutit JF. (1954).
13. Ferrebee, J. W., Lochte, H. L., Jaretzki, A., Sahler, O. D. & Thomas, E. D. Successful marrow homograft in the dog after radiation. *Surgery* **43**, 516–520 (1958).
14. Osgood E. Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow: case report. *Ann Intern Med* (1939).
15. Mathe G, Jammet H, Pendic B et ál. *Transfusions et greffes de moelle osseuse homologue chez des humains irradiés a haute dose accidentellement.*
16. Thomas ED, Storb R. *The development of the scientific foundation of hematopoietic cell transplantation based on animal and human studies.* (Boston: Blackwell Science, 1999).

17. Gatti, R. A., Meuwissen, H. J., Allen, H. D., Hong, R. & Good, R. A. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* **2**, 1366–1369 (1968).
18. Thomas, E. D., Lochte, H. L., Cannon, J. H., Sahler, O. D. & Ferrebee, J. W. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J. Clin. Invest.* **38**, 1709–1716 (1959).
19. Goodman, J. W. & Hodgson, G. S. Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood* **19**, 702–714 (1962).
20. Cavins, J. A., Scheer, S. C., Thomas, E. D. & Ferrebee, J. W. The recovery of lethally irradiated dogs given infusions of autologous leukocytes preserved at -80° C. *Blood* **23**, 38–42 (1964).
21. Körbling, M. *et al.* Successful engraftment of blood derived normal hemopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Exp. Hematol.* **9**, 684–690 (1981).
22. Gluckman, E. *et al.* Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N. Engl. J. Med.* **337**, 373–381 (1997).
23. E. Carreras, M. Rovira & C. Martinez. *Manual de Trasplante Hemopoyético.* (Antares, 2010).
24. Ferrara, J. L. & Deeg, H. J. Graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* **324**, 667–674 (1991).
25. Ferrara, J. L. M., Levine, J. E., Reddy, P. & Holler, E. Graft-versus-host disease. *Lancet* **373**, 1550–1561 (2009).
26. Weiden, P. L., Sullivan, K. M., Flournoy, N., Storb, R. & Thomas, E. D. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* **304**, 1529–1533 (1981).
27. Horowitz, M. M. *et al.* Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* **75**, 555–562 (1990).
28. Paczesny, S. *et al.* National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: III. The 2014 Biomarker Working Group Report. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **21**, 780–792 (2015).
29. Shlomchik, W. D. Graft-versus-host disease. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 340–352 (2007).
30. Billingham, R. E. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect.* **62**, 21–78 (1966).
31. Sackstein, R. A revision of Billingham's tenets: the central role of lymphocyte migration in acute graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **12**, 2–8 (2006).
32. Filipovich, A. H. *et al.* National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging

- working group report. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **11**, 945–956 (2005).
33. Jaglowski, S. M. & Devine, S. M. Graft-versus-host disease: why have we not made more progress? *Curr. Opin. Hematol.* **21**, 141–147 (2014).
 34. Goulmy, E. *et al.* Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* **334**, 281–285 (1996).
 35. Ferrara, J. L. M. & Yanik, G. Acute graft versus host disease: pathophysiology, risk factors, and prevention strategies. *Clin. Adv. Hematol. Oncol. HO* **3**, 415–419, 428 (2005).
 36. Flowers, M. E. D. *et al.* Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood* **117**, 3214–3219 (2011).
 37. Lim, J.-Y. *et al.* Interleukin 21 blockade modulates activated T- and B-cell homeostasis via B-cell activating factor pathway-mediated inhibition in a murine model of acute graft-versus-host disease. *Exp. Hematol.* **43**, 23–31.e2 (2015).
 38. Martínez-Laperche, C. *et al.* Achievement of early complete donor chimerism in CD25+ activated leukocytes is a strong predictor of the development of graft-versus-host-disease after stem cell transplantation. *Exp. Hematol.* **43**, 4–13.e1 (2015).
 39. Glucksberg, H. *et al.* Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* **18**, 295–304 (1974).
 40. Przepiorka, D. *et al.* 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant.* **15**, 825–828 (1995).
 41. Rowlings, P. A. *et al.* IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. *Br. J. Haematol.* **97**, 855–864 (1997).
 42. Cutler, C. & Antin, J. H. Novel drugs for the prevention and treatment of acute GVHD. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 1962–1973 (2008).
 43. Nash, R. A. *et al.* Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood* **96**, 2062–2068 (2000).
 44. Ratanatharathorn, V. *et al.* Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* **92**, 2303–2314 (1998).
 45. Perez, L., Anasetti, C. & Pidala, J. Have we improved in preventing and treating acute graft-versus-host disease? *Curr. Opin. Hematol.* **18**, 408–413 (2011).
 46. Jakubowski, A. A. *et al.* T cell-depleted unrelated donor stem cell transplantation provides favorable disease-free survival for adults with hematologic malignancies. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **17**, 1335–1342 (2011).

47. Appelbaum FR, Forman SJ, Negrin RS, Blume KG, editors. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2009. pp. 1287–1303. (2009).
48. Al-Homsi, A. S., Roy, T. S., Cole, K., Feng, Y. & Duffner, U. Post-Transplant High-Dose Cyclophosphamide for the Prevention of Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* (2014). doi:10.1016/j.bbmt.2014.08.014
49. Shaughnessy, P. J. *et al.* Extracorporeal photopheresis for the prevention of acute GVHD in patients undergoing standard myeloablative conditioning and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **45**, 1068–1076 (2010).
50. Kitko, C. L. & Levine, J. E. Extracorporeal photopheresis in prevention and treatment of acute GVHD. *Transfus. Apher. Sci. Off. J. World Apher. Assoc. Off. J. Eur. Soc. Haemapheresis* (2015). doi:10.1016/j.transci.2015.02.001
51. Luznik, L. *et al.* High-dose cyclophosphamide as single-agent, short-course prophylaxis of graft-versus-host disease. *Blood* **115**, 3224–3230 (2010).
52. Cutler C, Antin JH. in Appelbaum FR, Forman SJ, Negrin RS, Blume KG, editors. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2009. pp. 1287–1303.
53. Van Lint, M. T. *et al.* Early treatment of acute graft-versus-host disease with high- or low-dose 6-methylprednisolone: a multicenter randomized trial from the Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Blood* **92**, 2288–2293 (1998).
54. Levine, J. E. *et al.* Etanercept plus methylprednisolone as initial therapy for acute graft-versus-host disease. *Blood* **111**, 2470–2475 (2008).
55. Ibrahim, R. B. *et al.* Nonabsorbable corticosteroids use in the treatment of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **15**, 395–405 (2009).
56. Le Blanc, K. *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* **371**, 1579–1586 (2008).
57. Bruserud, Ø. *et al.* Extracorporeal photopheresis (photochemotherapy) in the treatment of acute and chronic graft versus host disease: immunological mechanisms and the results from clinical studies. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **63**, 757–777 (2014).
58. Pavletic SZ, Vogelsang GB. in In: Appelbaum FR, Forman SJ, Negrin R, Blume KG, editors. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2009. pp. 1304–1324.
59. Perreault, C. *et al.* Minor histocompatibility antigens. *Blood* **76**, 1269–1280 (1990).
60. Ferrara, J. L. & Krenger, W. Graft-versus-host disease: the influence of type 1 and type 2 T cell cytokines. *Transfus. Med. Rev.* **12**, 1–17 (1998).
61. Shimabukuro-Vornhagen, A., Hallek, M. J., Storb, R. F. & Bergwelt-Baildon, M. S. von. The role of B cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Blood* **114**, 4919–4927 (2009).

62. Carlens, S. *et al.* Risk factors for chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: a retrospective single centre analysis. *Bone Marrow Transplant.* **22**, 755–761 (1998).
63. Sullivan, K. M. *et al.* Chronic graft-versus-host disease and other late complications of bone marrow transplantation. *Semin. Hematol.* **28**, 250–259 (1991).
64. Vogelsang, G. B. How I treat chronic graft-versus-host disease. *Blood* **97**, 1196–1201 (2001).
65. Pavletic, S. Z. & Fowler, D. H. Are we making progress in GVHD prophylaxis and treatment? *ASH Educ. Program Book* **2012**, 251–264 (2012).
66. Wolff, D. *et al.* Consensus conference on clinical practice in chronic graft-versus-host disease (GVHD): first-line and topical treatment of chronic GVHD. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **16**, 1611–1628 (2010).
67. Greinix, H. T., Worel, N., Just, U. & Knobler, R. Extracorporeal photopheresis in acute and chronic graft-versus-host disease. *Transfus. Apher. Sci.* **50**, 349–357 (2014).
68. Heshmati, F. Extra corporeal photo chemotherapy (ECP) in acute and chronic GVHD. *Transfus. Apher. Sci. Off. J. World Apher. Assoc. Off. J. Eur. Soc. Haemapheresis* **43**, 211–215 (2010).
69. Edelson, R. *et al.* Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. Preliminary results. *N. Engl. J. Med.* **316**, 297–303 (1987).
70. Andreu, G. *et al.* Extracorporeal photochemotherapy: evaluation of two techniques and use in connective tissue disorders. *Transfus. Sci.* **15**, 443–454 (1994).
71. Daniell, M. D. & Hill, J. S. A history of photodynamic therapy. *Aust. N. Z. J. Surg.* **61**, 340–348 (1991).
72. Oliven, A. & Shechter, Y. Extracorporeal photopheresis: a review. *Blood Rev.* **15**, 103–108 (2001).
73. Lenner AB, Denton CR, Fitzpatrick TB *et al.* Clinical and experimental studies with 8-metoxypsoraleno in vitiligo. *J Invest Dermatol* **20**, 229–314 (1953).
74. Parrish, J. A., Fitzpatrick, T. B., Tanenbaum, L. & Pathak, M. A. Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light. *N. Engl. J. Med.* **291**, 1207–1211 (1974).
75. Menkes, C. J., Andreu, G., Heshmati, F. & Hilliquin, P. Extracorporeal photochemotherapy. *Br. J. Rheumatol.* **31**, 789–790 (1992).
76. Rook, A. H. *et al.* Treatment of systemic sclerosis with extracorporeal photochemotherapy. Results of a multicenter trial. *Arch. Dermatol.* **128**, 337–346 (1992).
77. Knobler, R. M. Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of lupus erythematosus: preliminary observations. *Springer Semin. Immunopathol.* **16**, 323–325 (1994).

78. Costanzo-Nordin, M. R. *et al.* Photopheresis versus corticosteroids in the therapy of heart transplant rejection. Preliminary clinical report. *Circulation* **86**, 11242–250 (1992).
79. Jaksch, P. *et al.* A prospective interventional study on the use of extracorporeal photopheresis in patients with bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **31**, 950–957 (2012).
80. Dall'Amico, R. & Messina, C. Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of graft-versus-host disease. *Ther. Apher. Off. J. Int. Soc. Apher. Jpn. Soc. Apher.* **6**, 296–304 (2002).
81. Schwartz, J. *et al.* Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice—evidence-based approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: the sixth special issue. *J. Clin. Apheresis* **28**, 145–284 (2013).
82. Heshmati, F. Updating ECP action mechanisms. *Transfus. Apher. Sci. Off. J. World Apher. Assoc. Off. J. Eur. Soc. Haemapheresis* **50**, 330–339 (2014).
83. Patel, J., Klapper, E., Shafi, H. & Kobashigawa, J. A. Extracorporeal photopheresis in heart transplant rejection. *Transfus. Apher. Sci. Off. J. World Apher. Assoc. Off. J. Eur. Soc. Haemapheresis* **52**, 167–170 (2015).
84. Gasparro, F. P., Felli, A. & Schmitt, I. M. Psoralen photobiology: the relationship between DNA damage, chromatin structure, transcription, and immunogenic effects. *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Prog. Dans Rech. Sur Cancer* **143**, 101–127 (1997).
85. Gasparro, F. P., Dall'Amico, R., Goldminz, D., Simmons, E. & Weingold, D. Molecular aspects of extracorporeal photochemotherapy. *Yale J. Biol. Med.* **62**, 579–593 (1989).
86. Gasparro, F. P., Chan, G. & Edelson, R. L. Phototherapy and photopharmacology. *Yale J. Biol. Med.* **58**, 519–534 (1985).
87. Rook, A. H. *et al.* Pathogenesis of cutaneous T-cell lymphoma: implications for the use of recombinant cytokines and photopheresis. *Clin. Exp. Immunol.* **107 Suppl 1**, 16–20 (1997).
88. Setterblad, N. *et al.* Extracorporeal photopheresis increases sensitivity of monocytes from patients with graft-versus-host disease to HLA-DR-mediated cell death. *Transfusion (Paris)* **48**, 169–177 (2008).
89. Hannani, D. *et al.* Photochemotherapy induces a faster apoptosis of alloreactive activated T cells than of nonalloreactive resting T cells in graft versus host disease. *Transplantation* **90**, 1232–1238 (2010).
90. Tambur, A. R. *et al.* Extracorporeal photopheresis induces lymphocyte but not monocyte apoptosis. *Transplant. Proc.* **32**, 747–748 (2000).
91. Russell-Jones, R. Shedding light on photopheresis. *Lancet* **357**, 820–821 (2001).
92. Bladon, J. & Taylor, P. C. Extracorporeal photopheresis: a focus on apoptosis and cytokines. *J. Dermatol. Sci.* **43**, 85–94 (2006).

93. Berger, C. L., Hanlon, D., Kanada, D., Girardi, M. & Edelson, R. L. Transimmunization, a novel approach for tumor immunotherapy. *Transfus. Apher. Sci. Off. J. World Apher. Assoc. Off. J. Eur. Soc. Haemapheresis* **26**, 205–216 (2002).
94. Steinman, R. M., Turley, S., Mellman, I. & Inaba, K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* **191**, 411–416 (2000).
95. Foss, F. M., Gorgun, G. & Miller, K. B. Extracorporeal photopheresis in chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* **29**, 719–725 (2002).
96. Fimiani, M., Di Renzo, M. & Rubegni, P. Mechanism of action of extracorporeal photochemotherapy in chronic graft-versus-host disease. *Br. J. Dermatol.* **150**, 1055–1060 (2004).
97. Huang, F. P. *et al.* A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Exp. Med.* **191**, 435–444 (2000).
98. Morelli, A. E. *et al.* Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* **101**, 611–620 (2003).
99. Hart, J. W., Shiue, L. H., Shpall, E. J. & Alousi, A. M. Extracorporeal photopheresis in the treatment of graft-versus-host disease: evidence and opinion. *Ther. Adv. Hematol.* **4**, 320–334 (2013).
100. Marshall, S. R. Technology insight: ECP for the treatment of GvHD--can we offer selective immune control without generalized immunosuppression? *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **3**, 302–314 (2006).
101. Andreu, G. *et al.* Extracorporeal photochemotherapy treatment for acute lung rejection episode. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **14**, 793–796 (1995).
102. Lim, H. W. & Edelson, R. L. Photopheresis for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **9**, 1117–1126 (1995).
103. Suchin, K. R. *et al.* Extracorporeal photochemotherapy does not suppress T- or B-cell responses to novel or recall antigens. *J. Am. Acad. Dermatol.* **41**, 980–986 (1999).
104. Bladon, J. & Taylor, P. Extracorporeal photopheresis normalizes some lymphocyte subsets (including T regulatory cells) in chronic graft-versus-host-disease. *Ther. Apher. Dial. Off. Peer-Rev. J. Int. Soc. Apher. Jpn. Soc. Apher. Jpn. Soc. Dial. Ther.* **12**, 311–318 (2008).
105. Yamashita, K. *et al.* Unique abnormalities of CD4(+) and CD8(+) central memory cells associated with chronic graft-versus-host disease improve after extracorporeal photopheresis. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **12**, 22–30 (2006).
106. Tsigotis, P. *et al.* Extracorporeal photopheresis in refractory chronic graft-versus-host disease: the influence on peripheral blood T cell subpopulations. A study by the Hellenic Association of Hematology. *Transfus. Apher. Sci. Off. J. World Apher. Assoc. Off. J. Eur. Soc. Haemapheresis* **46**, 181–188 (2012).

107. Lorenz, K. *et al.* Modulation of lymphocyte subpopulations by extracorporeal photopheresis in patients with acute graft-versus-host disease or graft rejection. *Leuk. Lymphoma* 1–5 (2014). doi:10.3109/10428194.2014.931956
108. Ratcliffe, N. *et al.* National Institutes of Health State of the Science Symposium in Therapeutic Apheresis: scientific opportunities in extracorporeal photopheresis. *Transfus. Med. Rev.* **29**, 62–70 (2015).
109. Cloud, T. M., Hakim, R. & Griffin, A. C. Photosensitization of the eye with methoxsalen. II. Chronic effects. *Arch. Ophthalmol.* **66**, 689–694 (1961).
110. Therakos, Inc. - The Global Leader in Autologous Immune Cell Therapy. *Therakos, Inc. - The Global Leader in Autologous Immune Cell Therapy* at <<http://www.therakos.com/>>
111. McLeod, B. C. *et al.* Frequency of immediate adverse effects associated with therapeutic apheresis. *Transfusion (Paris)* **39**, 282–288 (1999).
112. Flowers, M. E. D. *et al.* A multicenter prospective phase 2 randomized study of extracorporeal photopheresis for treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood* **112**, 2667–2674 (2008).
113. Couriel, D. R. *et al.* Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of steroid-resistant chronic GVHD. *Blood* **107**, 3074–3080 (2006).
114. Greinix, H. T. *et al.* Successful use of extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe acute and chronic graft-versus-host disease. *Blood* **92**, 3098–3104 (1998).
115. Pierelli, L. *et al.* Extracorporeal photopheresis for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease in adults and children: best practice recommendations from an Italian Society of Hemapheresis and Cell Manipulation (SIdEM) and Italian Group for Bone Marrow Transplantation (GITMO) consensus process. *Transfusion (Paris)* **53**, 2340–2352 (2013).
116. Owsianowski, M., Gollnick, H., Siegert, W., Schwerdtfeger, R. & Orfanos, C. E. Successful treatment of chronic graft-versus-host disease with extracorporeal photopheresis. *Bone Marrow Transplant.* **14**, 845–848 (1994).
117. Greinix, H. T. *et al.* The effect of intensified extracorporeal photochemotherapy on long-term survival in patients with severe acute graft-versus-host disease. *Haematologica* **91**, 405–408 (2006).
118. Greinix, H. T., Worel, N. & Knobler, R. Role of extracorporeal photopheresis (ECP) in treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **16**, 1747–1748; author reply 1749 (2010).
119. Abu-Dalle, I. *et al.* Extracorporeal Photopheresis in Steroid-Refractory Acute or Chronic Graft-versus-Host Disease: Results of a Systematic Review of Prospective Studies. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **20**, 1677–1686 (2014).
120. Malik, M. I. *et al.* Extracorporeal photopheresis for chronic graft-versus-host disease: a systematic review and meta-analysis. *Blood Res.* **49**, 100–106 (2014).

121. Zhang, H., Chen, R., Cheng, J., Jin, N. & Chen, B. Systematic review and meta-analysis of prospective studies for ECP treatment in patients with steroid-refractory acute GVHD. *Patient Prefer. Adherence* **9**, 105–111 (2015).
122. Hautmann, A. H. *et al.* Extracorporeal photopheresis in 62 patients with acute and chronic GVHD: results of treatment with the COBE Spectra System. *Bone Marrow Transplant.* **48**, 439–445 (2013).
123. Perfetti, P. *et al.* Extracorporeal photopheresis for the treatment of steroid refractory acute GVHD. *Bone Marrow Transplant.* **42**, 609–617 (2008).
124. Dignan, F. L. *et al.* Efficacy of bimonthly extracorporeal photopheresis in refractory chronic mucocutaneous GVHD. *Bone Marrow Transplant.* **47**, 824–830 (2012).
125. Ussowicz, M. *et al.* Steroid-sparing effect of extracorporeal photopheresis in the therapy of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant. Proc.* **45**, 3375–3380 (2013).
126. Perseghin, P. & Incontri, A. Mononuclear cell collection in patients treated with extracorporeal photochemotherapy by using the off-line method: a comparison between COBE Spectra AutoPbsc version 6.1 and Amicus cell separators. *J. Clin. Apheresis* **25**, 310–314 (2010).
127. Berger, M., Albiani, R., Sini, B. & Fagioli, F. Extracorporeal photopheresis for graft-versus-host disease: the role of patient, transplant, and classification criteria and hematologic values on outcome—results from a large single-center study. *Transfusion (Paris)* (2014). doi:10.1111/trf.12900
128. Das-Gupta, E. *et al.* Extracorporeal photopheresis for treatment of adults and children with acute GVHD: UK consensus statement and review of published literature. *Bone Marrow Transplant.* **49**, 1251–1258 (2014).
129. Heshmati, F. Extra corporeal photo chemotherapy (ECP) in acute and chronic GVHD. *Transfus. Apher. Sci. Off. J. World Apher. Assoc. Off. J. Eur. Soc. Haemapheresis* **43**, 211–215 (2010).
130. Zic, J. A., Miller, J. L., Stricklin, G. P. & King, L. E. The North American experience with photopheresis. *Ther. Apher. Off. J. Int. Soc. Apher. Jpn. Soc. Apher.* **3**, 50–62 (1999).
131. Lozano ML, Veronica Lopez 1Mariana Fernandez 1Inmaculada Heras 1Cristina Castilla-Llorente 1Vicente Vicente 1 *et al* & L Robertson, F Hammerton, J. Mayo, A. Alfred, P. Taylo. Prospective study of extracorporeal Photochemotherapy using a reduced intensity regimen in graft versus host disease. *Bone Marrow Transpl.* **49** S433-S437 (2014).
132. Hackstein, H., Amoros, J. J. V., Bein, G. & Woessmann, W. Successful use of miniphotopheresis for the treatment of graft-versus-host disease. *Transfusion (Paris)* **54**, 2022–2027 (2014).
133. Merlin, E. *et al.* Use of cryopreserved autologous cells for extracorporeal photochemotherapy: clinical applications. *Transfusion (Paris)* **51**, 1296–1299 (2011).
134. Florek, M. *et al.* Autologous apoptotic cells preceding transplantation enhance survival in lethal murine graft-versus-host models. *Blood* **124**, 1832–1842 (2014).

135. Crespo, C., Pérez-Simón, J. A., Rodríguez, J. M., Sierra, J. & Brosa, M. Development of a population-based cost-effectiveness model of chronic graft-versus-host disease in Spain. *Clin. Ther.* **34**, 1774–1787 (2012).
136. Perotti, C. & Sniecinski, I. A concise review on extracorporeal photochemotherapy: Where we began and where we are now and where are we going! *Transfus. Apher. Sci. Off. J. World Apher. Assoc. Off. J. Eur. Soc. Haemapheresis* (2015). doi:10.1016/j.transci.2015.04.011
137. Perseghin, P. *et al.* Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of chronic graft-versus-host disease: trend for a possible cell dose-related effect? *Ther. Apher. Dial. Off. Peer-Rev. J. Int. Soc. Apher. Jpn. Soc. Apher. Jpn. Soc. Dial. Ther.* **11**, 85–93 (2007).
138. Del Fante, C., Scudeller, L., Viarengo, G., Cervio, M. & Perotti, C. Mononuclear cell collection for extracorporeal photochemotherapy: a study comparing an automatic and a semiautomatic apheresis device. *Transfusion (Paris)* **53**, 2027–2033 (2013).
139. Perotti, C. *et al.* Feasibility and safety of a new technique of extracorporeal photochemotherapy: experience of 240 procedures. *Haematologica* **84**, 237–241 (1999).
140. Perotti, C. *et al.* Extracorporeal photochemotherapy in graft-versus-host disease: a longitudinal study on factors influencing the response and survival in pediatric patients. *Transfusion (Paris)* **50**, 1359–1369 (2010).
141. R. Whittle, H Denney, T. Maher, M Foster, R. Goodgrove, C Swift. Comparison of the CELLEX™ and UVAR XTS™ closed-system extracorporeal photopheresis devices in the treatment of chronic graft- versus host disease. *Bone Marrow Transpl.* **49** S433-S437 (2013).
142. Gambell, P. *et al.* Peripheral blood CD34+ cell enumeration as a predictor of apheresis yield: an analysis of more than 1,000 collections. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **18**, 763–772 (2012).
143. Yu, J., Leisenring, W., Bensinger, W. I., Holmberg, L. A. & Rowley, S. D. The predictive value of white cell or CD34+ cell count in the peripheral blood for timing apheresis and maximizing yield. *Transfusion (Paris)* **39**, 442–450 (1999).
144. Liu, C., Shah, K., Dynis, M., Eby, C. S. & Grossman, B. J. Linear relationship between lymphocyte counts in peripheral blood and buffy coat collected during extracorporeal photopheresis. *Transfusion (Paris)* **53**, 2635–2643 (2013).
145. González Vicent, M., Ramirez, M., Sevilla, J., Abad, L. & Díaz, M. A. Analysis of clinical outcome and survival in pediatric patients undergoing extracorporeal photopheresis for the treatment of steroid-refractory GVHD. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **32**, 589–593 (2010).
146. Del Fante, C., Scudeller, L., Viarengo, G., Bernasconi, P. & Perotti, C. Response and survival of patients with chronic graft-versus-host disease treated by extracorporeal photochemotherapy: a retrospective study according to classical and National Institutes of Health classifications. *Transfusion (Paris)* **52**, 2007–2015 (2012).