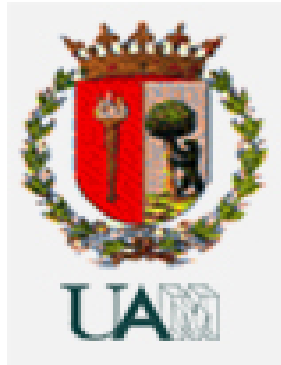


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**



**Los Trasplantes de Células
Hematopoyéticas No Mieloablativos
en Pediatría**

TESIS DOCTORAL

Óscar González Llano

Madrid, 2014

AGRADECIMIENTOS:

al Prof. Dr. **Luis Madero López**, por su excelente ayuda, por sus críticas constructivas y sobre todo por su constante apoyo académico durante la realización de la presente Tesis Doctoral.

al Prof. Dr. **Javier Regadera González**, fuerza y espíritu del Convenio que nos ha permitido, a mí y a muchos médicos de mi Facultad, lograr alcanzar un objetivo tan importante en nuestra vida académica.

a la Dra. **Inmaculada Santos Álvarez**, por todo su apoyo y conocimiento en la adecuada edición científica de este estudio.

al estudiante **Guillermo Cayetano Aguirre Fernández** por su desinteresado apoyo durante la elaboración del manuscrito.

al **Hospital Universitario de la UANL**, a quien le debo todo lo que soy como médico.

al **Convenio Bilateral Universidad Autónoma de Madrid - Universidad Autónoma de Nuevo León**, generoso Programa por el cual me ha sido posible llevar a cabo este proyecto.

DEDICATORIA:

*a mis padres, **Óscar** y **Julianita**,
y a mis hermanos **Ana**, **Poncho** y **Miguel**,
era imposible tener mejores*

al Dr. **David Gómez Almaguer**, mi profesor y amigo,
porque al poner “la vara tan alta”, me llevó a donde estoy

*a mis hijos, **Daniela** y **Óscar**,
porque quiero ser como ellos cuando sea grande*

*a **Consuelo**,
por ser fundamental en mi vida*

ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	9
ETAPAS DEL TRASPLANTE DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS	10
TIPOS DE TRASPLANTE	12
<i>Clasificación de los TCH Atendiendo al Tipo de Donante</i>	12
<i>Clasificación de los TCH Atendiendo a la Fuente de las Células</i>	13
<i>Clasificación de los TCH Atendiendo al Régimen de Acondicionamiento</i>	13
INDICACIONES PARA EL TCH	14
<i>Indicaciones Estándares para el TCH</i>	15
SELECCIÓN DEL DONANTE	17
<i>Donantes HLA Compatibles</i>	17
<i>Bancos de Unidades de Sangre de Cordón Umbilical (SCU)</i>	18
Programa de Donación de Unidades de SCU	19
Técnicas de Recolección de Unidades de SCU	19
ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED (EICH)	20
<i>Clasificación de la EICH</i>	22
Forma Aguda de la EICH	22
Variedad Crónica de la EICH	24
COMPLICACIONES DEL TCH	26
<i>Complicaciones Tempranas</i>	26
<i>Complicaciones Tardías</i>	30
<i>Complicaciones Infecciosas</i>	34
HISTORIA DEL TCH	36
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	44
RESULTADOS	46
PUBLICACIÓN 1	49
PUBLICACIÓN 2	56
PUBLICACIÓN 3	63
PUBLICACIÓN 4	74
PUBLICACIÓN 5	82
PUBLICACIÓN 6	93
PUBLICACIÓN 7	105

PUBLICACIÓN 8	119
PUBLICACIÓN 9	125
PUBLICACIÓN 10	135
DISCUSIÓN	152
LOS REGÍMENES MIELOABLATIVOS	153
LOS REGÍMENES NO MIELOABLATIVOS	154
<i>Mecanismo de Acción</i>	156
<i>Experiencia en Adultos</i>	158
<i>Experiencia en Niños</i>	160
<i>Trasplante con Regímenes No Mieloablativos y Sangre de Cordón</i>	162
<i>Trasplantes No Mieloablativos como Rescate y Donantes Haploidénticos</i>	163
<i>Estudios de Quimerismo</i>	164
<i>El Factor Económico de los Trasplantes No Mieloablativos</i>	164
<i>Conclusión</i>	164
<i>Los Trasplantes de Células Hematopoyéticas con Regímenes No Mieloablativos en un Hospital Universitario en México</i>	165
LOS PROBLEMAS DEL TCH EN MÉXICO	181
CONCLUSIONES	185
RESUMEN	187
SUMMARY	189
REFERENCIAS	191

ABREVIATURAS

CH:	células hematopoyéticas
CMV:	citomegalovirus
EBMT:	Grupo Europeo de Trasplante de Médula Ósea
EHCI:	enfermedad de huésped contra injerto
EICH:	enfermedad de injerto contra huésped
EICHa:	enfermedad de injerto contra huésped aguda
EICL:	efecto de injerto contra leucemia
EIT:	efecto de injerto contra tumor
ELISA:	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FEC-G:	factor estimulante de colonias granulocíticas
FISH:	hibridación <i>in situ</i> fluorescente
HLA:	antígenos leucocitarios humanos
IBMTR:	Registro Internacional de Trasplante de Médula Ósea
LLA:	leucemia linfoblástica aguda
LHH:	linfocitosis hemofagocítica
LMA:	leucemia mieloblástica aguda
LMC:	leucemia mieloide crónica
MO:	médula ósea
MRT:	mortalidad relacionada con el trasplante
NMDP:	Programa Nacional de Donantes de Médula
OP:	osteopetrosis
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
RCT:	radiación corporal total
RA:	régimen de acondicionamiento
RAIR:	régimen de acondicionamiento de intensidad reducida
SP:	sangre placentaria
SCU:	sangre de cordón umbilical
SG:	supervivencia global
SP:	sangre periférica
SLE:	supervivencia libre de evento

TCH:	trasplante de células hematopoyéticas
TCHIR:	trasplantes alogénicos de células hematopoyéticas de intensidad reducida
TG:	tracto gastrointestinal
TM:	trasplantes mieloablativos
TMO:	trasplante de médula ósea
TNM:	trasplantes no mieloablativos

INTRODUCCIÓN

El trasplante de médula ósea, más conocido en la actualidad como trasplante de células hematopoyéticas (TCH), es una opción terapéutica de gran importancia en la medicina moderna, se emplea para el tratamiento de enfermedades muy diversas, de etiología neoplásica y también en patologías graves no malignas, asimismo, se utiliza en la atención de enfermedades adquiridas y en muchas otras de carácter hereditario, y está indicado tanto en adultos como en pacientes pediátricos.

ETAPAS DEL TRASPLANTE DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS

Para entender mejor el TCH, específicamente el trasplante alogénico, conviene mencionar las diferentes etapas que constituyen el procedimiento; de manera inicial debe identificarse al potencial **candidato** para ser sometido al trasplante; idealmente, éste debe estar en condiciones generales estables y, cuando se trate de una enfermedad neoplásica en un estado de remisión, está claramente demostrado que un factor de gran importancia en el pronóstico del paciente trasplantado es el estado del paciente en el momento de ser llevado a cabo el procedimiento.^{1,2}

El siguiente paso es la **búsqueda de un donante**, que inicia con la determinación de los antígenos leucocitarios humanos (HLA); en la mayoría de los casos son los hermanos del paciente los primeros en ser estudiados con la intención de encontrar un donante que sea idéntico en el HLA. Generalmente, los antígenos del HLA I, que incluye los antígenos A, B y C, se estudian por metodología de mediana resolución, mientras que la determinación de los alelos del HLA II, es decir DR y DQ, se realiza con técnicas de alta resolución.³⁻⁵

Conviene mencionar que la probabilidad de encontrar un donante idéntico en el HLA entre los hermanos del paciente es aproximadamente el 30%.⁶ Una vez identificado el donante de las células hematopoyéticas (CH), ya sea un hermano idéntico, un familiar haploidéntico o alguien no emparentado familiarmente, se inicia la **movilización de los precursores hematopoyéticos** con la administración del factor estimulante de colonias granulocíticas (FEC-G), usualmente a una dosis de 5-10 mg/Kg/día durante cinco días consecutivos cuando la fuente de CH va a ser sangre periférica.⁷⁻⁹ Sin embargo, aunque también se puede efectuar estimulación en algunos casos de TCH de médula ósea, en la

mayor parte de los trasplantes de médula ósea y en los que se practican utilizando unidades de sangre de cordón umbilical (SCU), esta movilización no se lleva a cabo.

Durante los días previos a la infusión de las CH, independientemente de la fuente de las mismas, se inicia en el paciente la administración del **régimen de acondicionamiento** (RA) utilizando uno o más agentes quimioterapéuticos que pueden combinarse o no con la aplicación de radioterapia. Los regímenes de acondicionamiento en general se dividen en mieloablativos y no mieloablativos y éstos últimos serán motivo de una revisión más exhaustiva.¹⁰⁻¹⁴ Un día después de haber concluido con la administración del régimen de acondicionamiento, las CH son infundidas, la gran mayoría de las veces, a la sangre venosa del paciente. Recientemente se ha publicado la realización de TCH de unidades de SCU que son infundidas directamente en la médula ósea del paciente.^{15,16}

De acuerdo principalmente a la enfermedad de base, el período de tiempo en el cual el paciente se encuentra citopénico, en la llamada **fase aplásica** del TCH, puede comenzar al principio del procedimiento, por ejemplo en los casos de pacientes con anemia aplásica; sin embargo, otras veces esta fase se inicia varios días después de haber terminado el régimen de acondicionamiento y puede extenderse durante un período variable de tiempo que, en general, no es menor a diez días desde la infusión de las CH. Los factores de mayor influencia en la duración de la fase aplásica son la dosis de células infundidas, el estado general de la enfermedad por la cual se realizó el TCH y el régimen de acondicionamiento utilizado. Por otro lado, las complicaciones propias de esta fase del trasplante, principalmente las de origen infeccioso, serán descritas más adelante.

La siguiente fase del trasplante es la de **recuperación hematológica** y, como ya fue mencionado, no ocurre antes de los primeros diez días después de la infusión de las CH. Se considera que esta recuperación ha ocurrido cuando en dos días consecutivos se obtienen recuentos de neutrófilos mayores de $0.5 \times 10^9/L$ y, con respecto a la recuperación plaquetaria, cuando durante dos días consecutivos el paciente no requiere transfusiones plaquetarias y presenta un recuento de plaquetas superior a $30 \times 10^9/L$.¹⁷

La mayor parte de las veces, considerando el régimen de acondicionamiento utilizado, se considera que hay un **prendimiento o toma del injerto** cuando la recuperación hematológica ocurre en los primeros veinte días del trasplante. El prendimiento del injerto debe ser probado por medio de diferentes métodos para demostrar la presencia en el paciente de las células del donante.

La fase final en los TCH es la llamada **fase de reconstitución inmunológica**, donde el paciente cuenta ya con respuesta humoral y/o celular que pueden ser totales o parciales y que son derivadas del sistema inmune del donante.¹⁸⁻²⁰

TIPOS DE TRASPLANTE

Clasificación de los TCH Atendiendo al Tipo de Donante

Los TCH pueden ser clasificados de diferentes maneras, por ejemplo, de acuerdo a quién va a ser el donante de las CH, en este caso puede haber **trasplantes autólogos** conocidos también como **autotrasplantes**,²¹⁻²³ en donde el donante de las células es el mismo paciente. Está claro que en esta modalidad es de gran importancia que el paciente no presente afectación de su médula ósea o que, cuando esto ocurra, se lleven a cabo diferentes medidas para eliminarlas; entre estas medidas se incluye el uso de quimioterapia o anticuerpos monoclonales para realizar un efecto de "purgado" de las células neoplásicas contaminantes.^{24,25}

En la actualidad la mayor parte de los autotrasplantes se realizan obteniendo las CH de sangre periférica, previa movilización de las mismas con la administración del FEC-G; la movilización también se puede conseguir administrando el factor en combinación con quimioterapia.²⁶⁻²⁸ La principal ventaja de la obtención de las CH desde sangre periférica frente a médula ósea es la más rápida recuperación hematológica y, por lo tanto, la menor probabilidad de complicaciones secundarias al período de aplasia que sigue después de la administración del régimen de acondicionamiento.^{29,30}

Los trasplantes donde el donante de las CH es un gemelo idéntico del paciente se conocen como **trasplantes singénicos**.³¹ Finalmente, existen los **TCH alogénicos** que corresponden a aquellos en donde el donante es un individuo sano que puede, o no, estar

emparentado familiarmente con el paciente; la mayor parte de lo que será aquí discutido estará en relación con esta variedad de trasplantes.

Clasificación de los TCH Atendiendo a la Fuente de las Células

Otra forma de clasificar los TCH es la que considera el sitio o la fuente de donde se extraen las células. La **médula ósea (MO)** fue durante mucho tiempo el lugar más comúnmente utilizado, de hecho todavía se emplea con frecuencia. En este caso, las CH se obtienen por medio de la realización de múltiples punciones y aspiraciones de este tejido, generalmente de los huesos de la pelvis; el procedimiento se lleva a cabo en quirófano bajo anestesia general. Las complicaciones para el donante son menores del 0.5%. Una vez extraída la médula debe someterse a un proceso de remoción y filtración antes de ser infundida.³²

Las CH pueden ser también obtenidas de la **sangre periférica (SP)** del donante; para lograr que la cantidad de células sea la adecuada es necesario movilizar las CH desde la médula ósea hacia la sangre periférica, esto se realiza administrando solamente FEC-G en los casos de donantes sanos para trasplantes alogénicos.^{33,34}

Además, otra fuente de CH pueden ser **unidades de sangre de cordón umbilical (SCU)** que previamente habían sido congeladas y mantenidas en bancos creados para esos fines. Las unidades de SCU cuentan con algunas ventajas, como son, entre otras, su alta disponibilidad y el bajo riesgo para que se desarrolle la enfermedad de injerto contra huésped (EICH). La reducida cantidad de células CD34 + es con mucho la principal desventaja de esta variedad de fuente de CH.³⁵⁻³⁷

Clasificación de los TCH Atendiendo al Régimen de Acondicionamiento

Finalmente, los TCH pueden ser también divididos de acuerdo al régimen de acondicionamiento utilizado, de tal suerte que existen básicamente dos variedades, los **trasplantes mieloablativos (TM)**,³⁸ que corresponden a los métodos que se utilizaron en las primeras etapas de los trasplantes y que fueron los únicos que se emplearon hasta finales de la década de los años noventa, cuando se empezaron a publicar los primeros resultados con

trasplantes no mieloablativos (TNM).^{39,40} El objetivo en los primeros es producir un efecto de ablación de la médula ósea mediante la administración de dosis altas de quimioterapia, que pueden o no acompañarse de la aplicación de radioterapia; en los TNM el fundamento principal se basa más en lograr un efecto inmunosupresor, más adelante se discutirá en detalle esta variedad de regímenes de acondicionamiento.

INDICACIONES PARA EL TCH

EL tema de las indicaciones para llevar a cabo el TCH presenta una serie de situaciones particulares que deben ser discutidas, por un lado existen en la actualidad diversas fuentes de información que pueden ser consultadas para tomar la decisión correcta con respecto a qué paciente tiene o no una indicación para realizar el trasplante; sin embargo, también es muy importante saber que éste es un proceso que sufre modificaciones de manera continua, a la luz de los importantes avances que se dan en este campo por el surgimiento de nuevas técnicas, además de los cambios que se dan en lo referente a las fuentes de las CH, a los regímenes de acondicionamiento y muy especialmente al surgimiento de otras medidas terapéuticas.^{41,42} Además, también se debe agregar lo relacionado con el centro de trasplantes y el país donde se lleva a cabo el TCH; parece claro aceptar que, por ejemplo, las condiciones económicas de los diferentes países deban o puedan desempeñar un papel muy importante en la toma de decisiones.^{43,44}

En general se aceptan cuatro categorías en las que cada uno de los potenciales candidatos a un TCH debería estar incluido. La **indicación estándar** o de rutina se refiere a aquella en la que el trasplante ofrece un resultado mejor al que se lograría con un tratamiento diferente. La segunda variedad es la **opción terapéutica**, la que resulta tal vez más controvertida y en la que se agrupan a los pacientes con enfermedades poco comunes o con mayores riesgos, por la edad del paciente o las enfermedades preexistentes. Existe también la **indicación** conocida como **de desarrollo**, en la que se incluyen enfermos con padecimientos infrecuentes donde existe muy poca experiencia y se necesita mayor información para definir la indicación con mayor seguridad, estos casos son lo que pudieran estar incluidos dentro de investigaciones clínicas comparativas. Finalmente, están aquellos casos donde un **TCH no se recomienda** al no ofrecer mejores resultados que otros

tratamientos y por lo tanto no se justifica la morbilidad relacionada con el trasplante, ni las complicaciones a largo plazo.⁴¹

Indicaciones Estándares para el TCH

El TCH puede emplearse tanto en enfermedades neoplásicas como en otras con etiología no maligna y también se puede llevar a cabo en padecimientos adquiridos y en patologías congénitas. En términos generales se acepta que el TCH alogénico está indicado como rutina en los niños con **leucemia mieloblástica aguda (LMA)** de riesgo alto en primera remisión siempre y cuando exista un hermano HLA idéntico,⁴⁵⁻⁴⁷ asimismo no parece haber dudas acerca de someter a un trasplante alogénico a un paciente con LMA que se encuentre en segunda remisión, en este caso aún sin contar con un donante idéntico.^{48,49}

En la **leucemia linfoblástica aguda (LLA)** existe un pequeño grupo de pacientes en los que el TCH está recomendado en primera remisión, aquellos casos con mala respuesta a la ventana de siete días de prednisona, los que no logran remisión completa al final de una inducción con cuatro drogas o aquellos con translocaciones de muy mal pronóstico, como la 9:22.^{1,50,51}

Hay que insistir en que la decisión acerca del trasplante debe individualizarse hasta donde sea posible y siempre la debe tomar un grupo de médicos que participen en estos procedimientos; además, como ya fue mencionado, las indicaciones pueden cambiar en períodos cortos de tiempo a la luz de los nuevos resultados, por ejemplo, hasta hace algunos años, la presencia del cromosoma Philadelphia era siempre motivo para realizar un TCH, en la actualidad, sin embargo, se acepta que con el advenimiento de los inhibidores de la tirosina quinasa en algunos casos, especialmente aquellos donde no existen otros datos de pronóstico adverso, el trasplante puede ser dejado como una opción secundaria, aunque este aspecto sigue siendo controvertido.^{52,53}

Las otras enfermedades neoplásicas en niños que pueden llegar a ser una indicación para un trasplante son padecimientos menos comunes, como por ejemplo la **leucemia mieloide crónica (LMC)**, donde, a pesar de los resultados obtenidos en adultos con el uso de los inhibidores de la tirosina quinasa, en la población pediátrica -y considerando el largo

tratamiento que deberían recibir con estas drogas-, un TCH con un donante idéntico en fase crónica y con un régimen de intensidad reducida es la mejor opción terapéutica.^{54,55} En países en vías de desarrollo, en las **mielodisplasias**, especialmente las de riesgo desfavorable con exceso de blastos o blastos en transformación, un TCH alogénico con donante idéntico, o incluso con un donante haploidéntico, parece estar indicado.⁵⁶

Por otro lado, dentro de las **enfermedades no oncológicas**, el TCH se debe incluir como opción terapéutica de rutina en los casos de aplasia medular grave con un donante idéntico, o en aquellos sin donante compatible que no respondieron al tratamiento con inmunosupresión intensiva.^{57,58} Los pacientes con talasemia mayor, especialmente los que cuentan con un donante idéntico y altos requerimientos transfusionales, o los niños con drepanocitemia y factores de riesgo también deben ser considerados.^{59,60} Algunas inmunodeficiencias como el síndrome de inmunodeficiencia combinada grave, el síndrome de Wiskott-Aldrich y la neutropenia congénita de Kostmann son enfermedades donde el TCH ha logrado resultados muy alentadores.⁶¹⁻⁶³

Es claro que la experiencia del equipo que participa en la atención de estos pacientes es un aspecto muy importante en ésta y en cualquier área de la medicina moderna. Se acepta que el llamado efecto-centro juega un papel muy significativo en la evolución de los pacientes trasplantados. Los resultados de cada centro de trasplantes se evalúan de acuerdo a las tasas de prendimiento, recurrencia, mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) y supervivencia libre de evento (SLE), por citar algunos criterios. De manera empírica se ha sugerido que un centro donde se realicen TCH debe al menos practicar cada año diez procedimientos. Creí conveniente mencionar lo anterior en vista de que este factor no es considerado dentro de las diferentes características que hacen a un grupo tomar la decisión de llevar a cabo un TCH, parecería en mi opinión que también debería ser tomado en cuenta.^{64,65}

SELECCIÓN DEL DONANTE

Donantes HLA Compatibles

Entre los pacientes que requieren de un TCH alogénico sólo el 30 % contará con un donante HLA compatible entre sus hermanos; en general, cada hermano tiene un 25% de posibilidades de ser compatible con el paciente; para éste, la probabilidad de encontrar entre sus hermanos un donante incrementa con el número de hermanos que se estudien, la probabilidad exacta se obtiene con la siguiente fórmula: $1 - (3/4)^n$ donde n es el número de hermanos.⁶

Para los pacientes candidatos a un TCH alogénico que no cuenten con un hermano HLA idéntico (prácticamente tres cuartas partes del total), la única posibilidad que existía, hasta hace aproximadamente quince, años era la de encontrar un donante no emparentado en los registros internacionales que existen para estos fines y que se han venido desarrollando particularmente en los países industrializados desde 1980. En la actualidad, estos registros cuentan con más de 8 millones de donantes potenciales en todo el mundo.⁶⁶ A pesar de ello, el porcentaje de pacientes que no encontrarán por este mecanismo un donante continúa siendo muy elevado; lo cual es especialmente cierto en pacientes que forman parte de minorías raciales, o de países como el nuestro, donde estas bases de datos cuentan con un reducido número de donantes voluntarios.^{67,68}

Es importante mencionar también que en la búsqueda del donante de las CH, se requiere que la compatibilidad paciente-donante en el HLA sea idéntica. El rechazo del trasplante, la incidencia de EICH y la morbilidad y mortalidad relacionada con el procedimiento incrementan de manera significativa cuando el donante no cumple con este requisito. Así mismo, el tiempo que transcurre desde que el paciente se convierte en candidato para ser trasplantado hasta que el TCH se lleva a cabo puede llegar a ser lo suficientemente largo como para que la situación general del paciente se deteriore aún más, reduciendo con ello las posibilidades de éxito.⁶⁹

Bancos de Unidades de Sangre de Cordón Umbilical (SCU)

La existencia, desde hace poco más de diez años, de Bancos que almacenan unidades congeladas de sangre de cordón umbilical (SCU) ha permitido aumentar la probabilidad de realizar el procedimiento en los pacientes candidatos a un TCH.⁷⁰

De otra parte, las unidades criopreservadas en los Bancos de SCU ofrecen diferentes ventajas sobre los registros de donantes de médula ósea, por ejemplo, elevado número de donantes potenciales, carencia absoluta de riesgos para la madre y el recién nacido, menor incidencia de transmisión de enfermedades -especialmente infecciones virales-, gran reducción en el tiempo requerido para la localización de la unidad desde que se establece la indicación del TCH^{71,72} y, tal vez, una de las más importantes y que permite por sí misma que sea muy poco probable el hecho de no poder encontrar una unidad; me refiero a que en estos casos la compatibilidad en el HLA no tiene que ser completamente idéntica, al contrario que en los TCH donde las CH se obtienen de otras fuentes, esto puede explicarse por la menor capacidad inmunogénica de los antígenos de la sangre de cordón, permitiendo que se lleven a cabo trasplantes donde la compatibilidad puede ser en 6, 5 o 4 antígenos del HLA, de los 6 que la mayor parte de las veces son estudiados.⁷³

Hasta ahora hay almacenadas en los diferentes bancos más de 150.000 unidades de SCU, y se han realizado cerca de 4.000 TCH, prácticamente dos tercios de estos trasplantes han sido en niños.⁷⁴⁻⁷⁶

Sin duda, la principal desventaja de las unidades de SCU es la cantidad reducida de precursores hematopoyéticos que contienen. A pesar de ser un tejido rico en esta población celular, incluso en una muy buena recolección, sólo se obtienen alrededor de 100 ml, por lo que usualmente los TCH de unidades de SCU se recomiendan idealmente en pacientes de menos de 40Kg de peso.^{77,78} Sin embargo, en los últimos años se han venido publicando resultados promisorios en niños y adultos con enfermedades neoplásicas en estadios avanzados con la utilización de dos unidades.^{79,80}

Programa de Donación de Unidades de SCU

El programa de donación de unidades de SCU generalmente involucra tres aspectos muy importantes: el brindar información detallada acerca del procedimiento, los riesgos mínimos que esto implica tanto para la madre como para el recién nacido y la utilidad actual de éstas unidades, esto es especialmente cierto en las unidades de SCU que son manejadas por Bancos privados. En todos los casos, es fundamental realizar exámenes de laboratorio para la detección oportuna de padecimientos infecciosos y obtener el consentimiento informado.^{37,81}

Técnicas de Recolección de Unidades de SCU

Se han empleado diferentes técnicas para la recolección de las unidades de SCU, algunas utilizan técnicas abiertas que actualmente no son recomendadas y otros métodos son cerrados, o parcialmente cerrados, con lo que se disminuye mucho el riesgo para la contaminación por microorganismos o con células maternas. Para fines prácticos, existen dos métodos principales para la recolección de la SCU:

- **Recolección in útero:** en la que la sangre es obtenida antes de que la placenta se desprenda. Previa asepsia del cordón umbilical se realiza una punción con una bolsa de extracción, como las que se utilizan en una extracción de sangre de un donante de sangre habitual; dichas bolsas contienen una cantidad bien determinada de anticoagulante.
- **Recolección ex útero:** en la que la sangre es obtenida una vez que la placenta se ha desprendido del útero. Se utilizan punciones repetidas del cordón y la placenta por medio de jeringas asépticas.

Existe información contradictoria con respecto a las ventajas de cada uno de los dos métodos de recolección.^{82,83}

Conviene hacer ciertas consideraciones con respecto a la principal desventaja de las unidades de SCU que consiste, como ya se mencionó, en la cantidad reducida de CH que contienen. Hay que tener en cuenta que, dependiendo también de otros factores, como es el peso del paciente, esta cuenta reducida de células ocasionará un retraso en el

prendimiento del injerto y, por lo tanto, una recuperación hematológica más lenta que, a su vez, dará lugar a una prolongación de la fase aplásica y, por consiguiente, tasas más elevadas de morbilidad y mortalidad relacionadas con el trasplante. Por todo ello, contar con la mayor cantidad de CH en las unidades de SCU es de gran importancia en el área de los TCH de SCU.⁸⁴⁻⁸⁶

Por otra parte, es muy importante mencionar algunos aspectos acerca de los trasplantes con donantes haploidénticos, donde al menos donante y paciente comparten un haplotipo del HLA, este grado de incompatibilidad se relaciona con una tasa más alta de fracasos de injerto y también con una mayor probabilidad de que se desarrolle la enfermedad de injerto contra huésped (EICH). Resulta muy claro que la principal ventaja de este tipo de TCH que han estado efectuándose cada vez con mayor frecuencia en muchas partes del mundo es que por este medio prácticamente todos los pacientes que requieran un trasplante alogénico podrán contar con un potencial donante entre algún miembro de su familia, de esta manera, libramos uno de los más importantes obstáculos que se tienen para llevar a cabo un procedimiento de este tipo.^{87,88}

Es también importante mencionar que la incidencia elevada de EICH se acompaña además de un mayor efecto de injerto contra tumor (EIT) y por lo tanto las posibilidades de recaída pueden ser reducidas. Diversas estrategias han sido utilizadas para disminuir el riesgo de fracaso del injerto y de la EICH, entre otras, la depleción ex-vivo de linfocitos T y/o B y, más recientemente, la administración de ciclofosfamida en los primeros días después de la infusión de las CH. También se han publicado nuevos métodos basados en una depleción más selectiva de las células principalmente responsables de la EICH, que no interfiera, por otro lado, con las posibilidades de prendimiento del injerto.^{89,90}

ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED (EICH)

No parece haber dudas en el sentido de que la EICH es una de las condiciones de mayor importancia en los TCH. Básicamente se explica por un mecanismo genético mediado por la disparidad genética entre donante y receptor, donde los linfocitos inmunocompetentes del donante producen alteraciones en los tejidos de un huésped inmunocomprometido, incapaz de montar una respuesta inmune contra el donante.⁹¹

En la fisiopatología de la EICH se reconocen tres diferentes fases:

- Inicialmente se presenta un daño en diversos tejidos originado por los medicamentos y/o radiación utilizados en el régimen de acondicionamiento, además de los procesos infecciosos que el paciente pudiera experimentar en ese período de tiempo, y mediados por la secreción de sustancias proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral y la interleucina I.^{91,92}
- Posteriormente ocurre de manera primordial una activación de los linfocitos T que inicia con la presentación de antígenos del huésped por intermedio de las células dendríticas a los linfocitos T del donante, dando lugar a una activación y proliferación de estas células.
- Se presenta entonces una liberación de citoquinas proinflamatorias, como las Th1, el interferón gamma y la interleucina II.^{91,92}

Conviene recordar que una disparidad genética entre las células del donante y del receptor es una condición para que se presente la EICH. Esta disparidad genética ocurre incluso cuando existe un HLA idéntico entre donante y receptor, y se debe a la función que realizan los antígenos menores de histocompatibilidad, que corresponden a aloantígenos que son capaces de montar una respuesta de los linfocitos T.^{93,94}

Otros factores que influyen en la aparición de la EICH son:^{92,95-98}

- La fuente de obtención de las CH, donde, aún con datos que pueden resultar controvertidos -especialmente en la variedad aguda y bien aceptado en las formas crónicas de la EICH-, las CH de sangre periférica parecen estar relacionada con tasas de incidencia más elevadas.
- La disparidad en género entre donante y receptor, especialmente con donantes mujeres.
- La multiparidad en donantes.
- La variedad de régimen de acondicionamiento utilizado, donde los mieloablativos, especialmente aquellos en que se utiliza radiación corporal total, se relacionan con

una mayor incidencia de EICH cuando se comparan con regímenes no mieloablativos.

Clasificación de la EICH

En general la EICH puede dividirse en una forma aguda y una variedad crónica. Clásicamente se aceptaba que la primera era la que ocurría antes de que pasaran cien días después de la infusión de las CH, y crónica la que se presentaba después de este día. Sin embargo, en la actualidad es más importante el tipo de manifestaciones clínicas que el momento en que éstas se presentan.⁹⁹

Forma Aguda de la EICH

La forma aguda de EICH afecta principalmente hígado, piel y tubo gastrointestinal, las células blanco de estos órganos son sobre todo células epiteliales. En el caso del hígado el daño principalmente se encuentra en el epitelio de los canalículos biliares. Usualmente la forma aguda de ECH se manifiesta después de los diez días posteriores al trasplante y, de forma habitual, dentro de las primeras seis semanas. La manifestación más común es ictericia colestática y el fallo hepática es raro. En la piel se manifiesta por una erupción máculo-papular generalizada que involucra también palmas y plantas, puede ocasionar prurito y, en los casos graves, pueden verse incluso vesículas y ámpulas. En cuanto a la afectación del tubo digestivo, se manifiesta con hiporexia, náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal e incluso sangrado de tubo digestivo.¹⁰⁰

Para tratar de clarificar la afectación de la forma aguda de EICH se han diseñado desde hace muchos años diversos sistemas de estadios clínicos y de graduación de la gravedad de la enfermedad. Estos sistema has sufrido diversas modificaciones con el paso del tiempo, en términos generales el **grado I** corresponde a una forma leve de la enfermedad, no requiere tratamiento y se asocia cuando ocurre con un mejor pronóstico. A partir del **grado II** que corresponde a una enfermedad moderada, los pacientes requieren alguna medida terapéutica. Los **grados III y IV** son considerados como formas graves, en ellos se encuentra una disminución en las tasas de supervivencia. Recientemente el International Bone Marrow

Trasplant Register (IBMTR) y el grupo del Fred Hutchinson Cancer Research Center han introducido sistemas diferentes al originalmente creado en 1995.^{101,102}

La **prevención de EICH** en general se lleva a cabo por medio de la depleción de los linfocitos T, o con la utilización de diferentes agentes inmunosupresores, entre éstos se encuentran los inhibidores de la calcineurina (como la ciclosporina A o el tacrolimus) y el metotrexato. Estas tres drogas son las más utilizadas, usualmente de manera combinada, existiendo diversos estudios que comparan estas combinaciones.^{103,104} Su uso es muy variable y generalmente los diferentes centros utilizan una sola combinación de manera rutinaria. Todos son capaces de producir efectos colaterales por lo que la adecuada monitorización de los niveles séricos de los diferentes medicamentos es de gran importancia. En este sentido, se conoce el efecto del metotrexato en el agravamiento de la mucositis, que puede ocurrir en muchos pacientes que la habían desarrollado por la acción del régimen de acondicionamiento; asimismo, se conoce también la neuro y nefrotoxicidad relacionada con los inhibidores de la calcineurina. Otros medicamentos que han sido utilizados con estos mismos fines son los corticoesteroides, el sirolimus y el mofetilo de mofetilo.¹⁰⁴

Como ya se mencionó, la depleción de linfocitos T por diferentes métodos también se ha utilizado para prevenir la EICH, esta depleción puede llevarse a cabo por medio de depleción ex-vivo, o con la acción de anticuerpos monoclonales con efecto sobre linfocitos T, como el alemtuzumab o la administración de globulina anti-timocito. No parece que ninguno de estos métodos ofrezca mejores resultados en la prevención de la EICH que las opciones citadas previamente.^{105,106}

El **tratamiento** más utilizado como primera línea para la forma aguda de la EICH sigue siendo la administración de corticoesteroides, generalmente metilprednisolona a 2 mg/Kg/día.^{107,108} Una vez iniciado el tratamiento, se considera pasar a una segunda etapa si hay progresión de la enfermedad después de tres días de manejo, o cuando no hay respuesta después de cinco días. En vista de que la respuesta completa a la administración del corticoesteroide ocurre aproximadamente en la mitad de los casos, se ha descrito una serie de medicamentos como opciones de segunda línea para la resolución del problema; la

mayor parte de estos se utilizan en combinación con el esteroide.¹⁰⁸ Entre estas opciones se incluyen los anticuerpos monoclonales, como el daclizumab, alemtuzumab y rituximab, además de otras drogas, donde se incluyen sirolimus, globulina anti-timocito, anticuerpo contra el factor de necrosis tumoral o contra su receptor, pentostatina y micofenolato de mofetilo, entre otros.¹⁰⁹⁻¹¹¹

No hay descrita una estrategia aceptada por todos para el manejo de los pacientes que desarrollan EICH aguda refractaria a corticoesteroides; sin embargo, debe aceptarse que cualquiera de los medicamentos mencionados incrementará la inmunosupresión del enfermo y, por lo tanto, el riesgo para desarrollar complicaciones infecciosas graves. También debe conocerse que existen algunas opciones que parecen ser más útiles para algunas presentaciones de la enfermedad, como por ejemplo el dipropionato de beclometasona para el tratamiento de las afectaciones de tubo digestivo alto.¹¹²

Variedad Crónica de la EICH

La forma crónica de EICH se explica por la acción de los linfocitos T del donante que no logran desarrollar tolerancia frente a los linfocitos del receptor. Los mecanismos por medio de los cuales los linfocitos T generan daño tisular incluyen acción citotóxica directa, liberación de citoquinas pro-inflamatorias y activación de linfocitos B que, a su vez, generaran la producción de anticuerpos.^{92,113}

Clásicamente se aceptaba que la forma crónica de EICH ocurría después de los primeros cien días del TCH; en la actualidad, se sabe que puede presentarse más tempranamente.⁹⁹ Las manifestaciones clínicas de la EICH crónica son muy variadas e incluyen la afectación de la piel -que puede llegar a ser generalizada-, mucosas -donde se puede manifestar como queratoconjuntivitis-, cicatrices en esófago y vagina, mucositis en cavidad oral, afectación pulmonar -manifestada como bronquiolitis obliterante que puede manifestarse incluso como insuficiencia respiratoria- y afectación hepática -que se manifiesta primero con ictericia dependiente de bilirrubina directa y aumento de la fosfatasa alcalina, y, cuando progresa, el daño de los canalículos biliares asemeja a los cambios observados en la cirrosis biliar primaria.¹¹⁴

El factor más importante que determina su incidencia es la disparidad en la compatibilidad entre donante y receptor, las tasas de esta complicación están directamente relacionadas con el grado de compatibilidad, donde la menor probabilidad de aparición es con trasplantes de donantes familiares idénticos, después con donantes familiares que muestren algún grado de disparidad y, finalmente, donde ocurre más frecuentemente es en los TCH de donantes no emparentados familiarmente. Se acepta también que el momento en que se presenta la EICH crónica depende del grado de disparidad, apareciendo más tempranamente en los TCH de donantes no emparentados y más tardíamente cuando el trasplante es de un donador familiar idéntico. Otros factores que también han sido implicados incluyen el antecedente de haber padecido EICH aguda, la edad avanzada del receptor del trasplante, la utilización de sangre periférica como fuente de CH -donde se ha sugerido que puede llegar a ser más resistente al tratamiento-, la infusión de linfocitos del donante y el hecho de que el donante sea mujer y el receptor varón, entre otros.¹¹⁵

Está aceptado que la EICH crónica puede ser **limitada** –variedad que usualmente no requiere tratamiento-, y **extensa** -donde el paciente debe recibir manejo inmunosupresor. Al igual que en la forma aguda se han propuesto, desde hace ya muchos años y hasta la actualidad, diversos sistemas de clasificación que incluyen otros datos, además del de la extensión de la enfermedad; asimismo, se ha sugerido que estos datos tienen implicaciones pronósticas, por ejemplo la trombocitopenia, la afectación generalizada y progresiva de la piel, el fallo en la respuesta al tratamiento inicial y el estado general del enfermo evaluado por las escalas de Karnofsky o de Lansky.¹¹⁶

El Registro Internacional de Trasplante de Médula Ósea (IBMTR) ha propuesto recientemente una clasificación pronóstica que incluye el estado general evaluado por la escala de Karnofsky, la presencia de diarrea crónica, la pérdida de peso y el grado de afectación cutánea.¹¹⁷ Se acepta la implicación de la EICH crónica tanto en el pronóstico del paciente como en la presencia del efecto de injerto contra tumor o contra leucemia, esta relación se discutirá en detalle cuando se mencionen los aspectos más importantes de los TCH no mieloablativos.

El **tratamiento** de primera línea de la EICH crónica se basa usualmente en la combinación de prednisona y ciclosporina, esta combinación es especialmente útil en los casos de alto riesgo, por ejemplo, en aquellos con enfermedad extensa en piel asociada a trombocitopenia; por otro lado, en los pacientes de riesgo estándar no parece haber beneficio con el uso de esta combinación cuando se compara contra solo prednisona.¹¹⁸

Como tratamientos de segunda línea se han probado muchas opciones terapéuticas, entre ellas se encuentran micofenolato de mofetilo y sirolimus. Los porcentajes de respuestas completas varían de acuerdo a la experiencia de cada centro, la mayor parte de las veces, sin embargo, se obtienen principalmente solo respuestas parciales.¹¹⁸

En vista de la susceptibilidad que muestran las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T activados a la acción de la radiación ultravioleta en presencia de 8-metoxipsoraleno, la fotoféresis extracorpórea también ha sido utilizada en la EICH crónica. Su uso se recomienda más en la afectación grave de piel e hígado, sin embargo, como con las otras opciones mencionadas, la mayor parte de las respuestas suelen ser parciales.^{119,120}

COMPLICACIONES DEL TCH

Las complicaciones en los TCH se pueden dividir, de manera arbitraria y para su mejor comprensión, en tres categorías: las que ocurren tempranamente, las que se manifiestan de manera tardía y, finalmente, los procesos infecciosos. La serie de circunstancias que rodean a los trasplantes hacen que las complicaciones sean una historia muy común, es realmente muy poco probable que un trasplante no curse, al menos, con alguna complicación menor.

Complicaciones Tempranas

Las **náuseas** y los **vómitos** son las complicaciones más comúnmente observadas, la mayor parte de las veces son secundarias a la administración de dosis altas de los agentes quimioterapéuticos.^{121,122} En los últimos años, con el surgimiento de los antagonistas de los receptores tipo 3 de la serotonina de primera y segunda generación, la mayor parte de las veces se logran muy buenos resultados en su atención, este tipo de medicamentos pueden ser utilizados solos o en combinación con otros fármacos, como los corticoesteroides. Otro grupo de medicamentos utilizados para los mismos fines son los inhibidores de la

neurocinina 1, también con muy buenos resultados en general y, al igual que los setrones, utilizados solos o en combinación.¹²³

Es muy importante considerar que la quimioterapia y la radioterapia no son las únicas causas de que un paciente manifieste estas complicaciones, especialmente si se presentan varios días después de haber terminado el régimen de acondicionamiento. En este momento se deben considerar también otras opciones, como la EICH, la mucositis y el uso concomitante de drogas emetogénicas.

La **mucositis** puede solo involucrar a la mucosa oral, sin embargo, es común también la afectación de todo el tubo digestivo, siendo una de las complicaciones más frecuentes; cuando se presenta puede traducirse en diversos problemas, por ejemplo, internamientos más largos, necesidad del uso de analgésicos, posibilidad del uso de alimentación parenteral y además mayor riesgo de infecciones asociadas y, por lo tanto, un incremento en el uso de antibióticos.¹²⁴

Se han sugerido diferentes factores de riesgo en la presentación de la mucositis, como edad, género, estado nutricional e higiene bucal, por mencionar algunos; no obstante, el tipo de régimen de acondicionamiento es el único que tiene un peso específico por sí mismo. Es claro que cuando son utilizados regímenes mieloablativos las probabilidades de aparición son sensiblemente más elevadas que cuando son utilizados regímenes de intensidad reducida.¹²⁵ Como en otras toxicidades existen diferentes opciones para llevar a cabo una graduación de su gravedad, la del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América es una de las más utilizadas.¹²⁶

El manejo de la mucositis es básicamente paliativo con el adecuado control del dolor y de la higiene. Se ha referido también el uso de diferentes agentes y procedimientos con la intención de generar un efecto citoprotector, entre estos se incluyen opciones tan sencillas como el uso del hielo picado o el agua del hielo derretido antes y durante la aplicación de la quimioterapia. También se han publicado otras opciones para estos fines, incluyendo factores de crecimiento granulocítico y de macrófagos¹²⁷ y factor recombinante estimulante

de queratinocitos con resultados satisfactorios en general, especialmente con éste últim.^{128,129}

La **diarrea** es otra complicación frecuente en los TCH, al igual que con la mucositis, la causa que explica su aparición la mayor parte de las veces es la administración de dosis altas de quimioterapia y/o radioterapia y también, a veces, es muy difícil distinguirla de la diarrea secundaria a la EICH. Como fue mencionado con respecto a la mucositis, se acepta que la diarrea que ocurre en las primeras tres semanas después de la infusión de las CH se explica, la mayor parte de las veces, por la acción de medicamentos o radiación. En general el tratamiento es paliativo con el uso de medicamentos, como la loperamida, pero existen informes de buenos resultados con la administración de suplementos de glutamina, especialmente por la menor incidencia de procesos infecciosos y de EICH.^{122,130}

Una complicación grave y afortunadamente poco común es la conocida como **síndrome microangiopático trombótico** asociado al TCH, que puede ocurrir tanto en los trasplantes alogénicos como en los autotrasplantes. Consiste básicamente en anemia hemolítica microangiopática, manifestada por anemia, hiperbilirrubinemia indirecta, elevación de la deshidrogenasa láctica y presencia en el frotis sanguíneo de esquistocitos y trombocitopenia.

Los factores relacionados con esta complicación son la presencia de EICH, CH obtenidas de donante no relacionado y uso de radiación corporal total en el régimen de acondicionamiento, también ha sido mencionado como factor predisponente el uso de tacrolimus y busulfan, especialmente cuando el busulfan se utiliza a una dosis de 16 mg/Kg. La mortalidad de este síndrome puede llegar a ser de hasta el 50% y en su tratamiento se ha sugerido el recambio plasmático y la administración de rituximab en los casos refractarios.¹³¹

La **enfermedad veno oclusiva hepática o síndrome de obstrucción sinusoidal**, definida como la obstrucción no trombótica de las vénulas hepáticas y daño de los hepatocitos de la región centrolobulillar, y que se traduce en una hepatopatía tóxica grave, usualmente se presenta dentro de los primeros días del trasplante, pero puede ocurrir incluso durante la administración del régimen de acondicionamiento. Se asocia con mayor frecuencia a la

aplicación de dosis altas de busulfan y de radiación corporal total. Las características típicas de esta complicación son aumento de peso, ictericia y hepatomegalia.

El diagnóstico preciso muchas veces requiere realizar una biopsia hepática. Recientemente se ha recomendado practicar esta biopsia por vía transvenosa ya que ha resultado más segura que la biopsia tradicional, además ofrece la posibilidad de medir la presión intrahepática, donde una determinación mayor de 10 mm es muy sugestiva del diagnóstico.¹³² Otros dos factores implicados en su etiología, a parte de los ya referidos (busulfan y radiación corporal total), son haber iniciado el trasplante con elevación de las enzimas hepáticas y haber utilizado como fuente de CH un donante no emparentado familiarmente.¹³³

Se ha recomendado utilizar de manera preventiva en los pacientes de riesgo la administración de defibrotide intravenoso, éste actúa disminuyendo el factor tisular, que tiene un efecto procoagulante, e incrementando también el activador del plasminógeno tisular, que aumenta la actividad fibrinolítica. El defibrotide también es utilizado como medida terapéutica en los casos ya diagnosticados, donde es necesario también llevar a cabo otras medidas, como evitar drogas hepatotóxicas, restricción de líquidos y administración de diuréticos.

La mortalidad de esta complicación se encuentra entre el 18 y 50%, es claro que especialmente en los pacientes de riesgo la prevención de esta complicación con la administración del defibrotide o el diagnóstico temprano son muy importantes para evitarla o para lograr su resolución.^{134,135}

La **cistitis hemorrágica** se explica en los trasplantes por la administración de las dosis altas de ciclofosfamida incluidas en muchos de los regímenes de acondicionamiento que se utilizan en los TCH. El responsable del daño en el epitelio vesical es un metabolito de la droga que se llama acroleína. La prevención de la cistitis hemorrágica es la mejor conducta para su manejo, ésta se lleva a cabo mediante una enérgica hidratación del paciente durante la aplicación de la ciclofosfamida y la administración del inhibidor de la acroleína, el mesna, el cual se aplica simultáneamente con la ciclofosfamida en una relación 1 a 1.^{136,137} En otros

casos, la cistitis hemorrágica es secundaria a infecciones virales, como los polyomavirus BK y JC, adenovirus y, menos frecuentemente, el virus citomegálico.^{138,139}

La mayor parte de las complicaciones pulmonares en los trasplantes se explican por procesos infecciosos, sin embargo estas serán discutidas más adelante. Dos situaciones graves y que se observan con relativa frecuencia en los trasplantes son la neumonía intersticial y la hemorragia alveolar difusa. La **neumonía intersticial** se puede presentar hasta en el 35% de los TCH alogénicos, especialmente en las fases tardías del procedimiento y probablemente asociada a la EICH, también puede observarse en los trasplantes autólogos, pero con mucha menor frecuencia. Además, ya ha sido determinado que la incidencia de esta complicación es mayor cuando se utilizan regímenes mieloablativos que cuando se practican con regímenes de intensidad reducida. El diagnóstico de leucemia aguda y la EICH grado IV son factores muy importantes asociados a la neumonía intersticial, sus manifestaciones son muy parecidas a aquellas observadas en el síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto.¹⁴⁰

La **hemorragia alveolar difusa** se asocia a trombocitopenia y al daño alveolar causado por la degranulación de los neutrófilos: Usualmente se presenta en las primeras semanas del trasplante y sus manifestaciones clínicas incluyen tos, disnea, fiebre, hipoxia, caída en la cifra de hemoglobina de manera brusca y radiografía de tórax anormal, caracterizada por infiltrados alveolares intersticiales. La mortalidad puede ser superior al 80%.

El diagnóstico se establece generalmente mediante lavados bronquioalveolares que demuestran la presencia de sangrado alveolar y ausencia de datos que sugieran sangrado de vía aérea superior. El tratamiento debe iniciarse rápidamente a base de transfusiones de plaquetas, el uso de corticoesteroides es controvertido.¹⁴¹

Complicaciones Tardías

Las complicaciones crónicas del TCH en su variedad alogénica son secundarias básicamente al régimen de acondicionamiento utilizado y a la EICH. Si bien es cierto que con el paso de los años se ha adquirido más experiencia en la atención de los pacientes logrando mejorar su pronóstico, también es cierto que cada vez es más frecuente en la consulta

atender pacientes con complicaciones crónicas propias del trasplante que, aún no ocasionando la muerte, sí hacen que la calidad de vida de los pacientes se vea afectada.¹⁴²

En la piel, la EICH se puede manifestar como **eritema papular** de distribución variable semejando liquen plano, en la forma esclerodérmica la piel se observa gruesa y dura incluso con cambios en la pigmentación, en los casos más graves pueden incluso formarse vesículas, la afectación puede incluir glándulas sudoríparas y uñas y es posible también observar alopecia de grado variable.¹⁴³

En los ojos ocurre **irritabilidad y queratitis** y cuando se involucran las glándulas lagrimales se manifiesta con ardor, fotofobia y sequedad.¹⁴⁴ Por otra parte, en la cavidad oral la EICH se presenta con **sequedad de la mucosa e hipersensibilidad para tolerar los alimentos**, en ocasiones puede ocurrir también **odinofagia** que generalmente denota un mayor grado de afectación, es muy común observar infecciones agregadas, generalmente virales.¹⁴⁵

Cualquier **citopenia** que se encuentre en un paciente trasplantado se puede explicar por EICH crónica, pero es importante considerar que puede tratarse de un proceso autoinmune.¹⁴⁶ En el sistema respiratorio la **bronquiolitis obliterante** es la manifestación crónica más común y más grave por EICH crónica, se manifiesta por tos y disnea progresivas. Es claro que se deben considerar una serie de patologías ya que pueden tener las mismas manifestaciones. La tomografía computarizada de tórax y las pruebas de función pulmonar son necesarias para su diagnóstico. El pronóstico de esta complicación usualmente es grave.¹⁴⁷ La afectación hepática se manifiesta por **ictericia colestática** y, en vista de que puede ser secundaria también a infecciones virales o a toxicidad por drogas, con frecuencia se requiere una biopsia hepática.¹⁴⁸

Por otro lado existen otras complicaciones crónicas que se encuentran más relacionadas con los regímenes de acondicionamiento utilizados que a la EICH, por ejemplo el **hipotiroidismo**, que puede o no estar compensado y que ocurre en la mayoría de los pacientes que recibieron radiación corporal total, pero en muy pocos de los que reciben regímenes no mieloablativos.¹⁴⁹

Alteraciones en el crecimiento de los pacientes trasplantados es otra de las complicaciones; en estos casos, se ha documentado un déficit en los niveles de la hormona de crecimiento. La mayor parte de las veces la radioterapia formó parte del régimen de acondicionamiento, la ciclofosfamida a dosis alta también está relacionada con esta complicación. Para su tratamiento se debe aplicar hormona de crecimiento, sin embargo los resultados de la terapia no son satisfactorios en todos los casos.¹⁵⁰

La **afectación gonadal** en los pacientes trasplantados es muy variable y depende de muchos factores. En varones, la afectación de la espermatogénesis es más común que la que ocurre en las células productoras de testosterona, de tal suerte que el remplazo hormonal es algo poco común en estos enfermos; los ovarios son mucho más vulnerables a la acción de la quimioterapia (especialmente busulfan) y radioterapia por lo que el hipogonadismo es prácticamente la regla.¹⁵¹

En los niños varones el hipogonadismo ocurre en más del 70% de los pacientes que recibieron un TCH, en estos casos se deben realizar determinaciones de testosterona. La fertilidad post-trasplante depende de varios factores, la mujeres en general son más afectadas que los varones especialmente cuando se someten al trasplante después de los 25 años de edad. También es importante el régimen de acondicionamiento utilizado, donde en general la radiación corporal total es más tóxica que la quimioterapia. Como una buena parte de los pacientes trasplantados por enfermedades no malignas no reciben radiación corporal en el acondicionamiento, las posibilidades de lograr un embarazo en ellos son más altas que cuando se trasplantaron por enfermedades malignas, donde sí recibieron radiación en el régimen de acondicionamiento.^{152,153}

La **enfermedad pulmonar obstructiva crónica** en pacientes trasplantados puede ocurrir hasta en el 20% de los pacientes sin que esté en relación con EICH; en estos casos, la radiación corporal total y las infecciones pueden contribuir en su etiología, generalmente se manifiesta por tos no productiva y disnea y, como ya se mencionó, se debe hacer el diagnóstico diferencial con procesos infecciosos y con la bronquiolitis obliterante relacionada con EICH.¹⁵⁴

Las **cataratas** ocurren en casi todos los pacientes que recibieron radiación corporal total, se diagnostican usualmente en los primeros tres o cuatro años después del TCH y muchas veces no es necesario tratamiento quirúrgico. Además de por radiación, su aparición se asocia con la ingesta crónica de corticoesteroides.¹⁵⁵

Por otro lado, la **queratoconjuntivitis** usualmente se acompaña de otras manifestaciones como parte del síndrome de sicca, entre otras, vaginitis, xerostomía y sequedad de la piel, todo lo anterior en relación a EICH crónica. El síndrome referido puede presentarse hasta en el 20% de los enfermos y, además del EICH crónico, se ha sugerido que la radiación corporal total, el género femenino, una edad superior a 20 años y el metotrexato pueden influir en su presentación.¹⁵⁶

La **necrosis avascular** es una complicación crónica en trasplantes que tiene una incidencia aproximada de hasta el 10%, en la mitad de ellos la afectación es bilateral y en poco más del 80% de los casos ocurre en la cadera. El factor más importante implicado es la administración de corticoesteroide durante largos periodos de tiempo, usualmente utilizados como manejo de la EICH, el tratamiento para los casos más graves suele ser quirúrgico.¹⁵⁷

Los **síndromes linfoproliferativos** relacionados con el TCH son padecimientos heterogéneos que se presentan con una baja incidencia y, generalmente, con origen en las células B y por disfunción de los linfocitos T. Las formas más comunes se manifiestan en los primeros seis meses después del trasplante; la participación del virus Epstein-Barr en su etiología es muy importante, siendo la determinación cuantitativa de la carga viral una de las pruebas más relevantes para el diagnóstico. Generalmente se manifiesta por fiebre, adenomegalia y afectación de órganos distintos a los del sistema hematopoyético. Recientemente, se ha recomendado para su tratamiento la administración del anticuerpo monoclonal anti CD-20 (rituximab).¹⁵⁸

Complicaciones Infecciosas

Las infecciones desempeñan un papel de primer orden en los TCH. Considerando que los pacientes manifiestan, incluso desde antes del procedimiento, alteraciones en su

inmunidad de manera cualitativa y cuantitativa y que además se afectan la humoral y la celular, se entiende fácilmente su participación en la morbilidad y en la mortalidad de este grupo de pacientes. Se deben tomar importantes medidas de prevención además del tratamiento oportuno cuando las infecciones se sospechan o se diagnostican.

Una de las medidas de prevención más importantes y aceptada por todos los grupos es la que se refiere al estricto lavado de manos y a la prevención de infecciones respiratorias.^{159,160}

Las condiciones del paciente, desde el punto de vista de las enfermedades infecciosas previo al inicio del trasplante, deben ser evaluadas; de este análisis se desprenderán una serie de medidas que se tendrán en cuenta cuando el trasplante se ponga en marcha, entre otras, la serie de medicamentos que son utilizados en esta etapa de manera profiláctica: nitazoxanida, fluconazol, acyclovir y trimetoprim.¹⁶¹

Las **infecciones bacterianas** en los pacientes neutropénicos son siempre complicaciones que ponen en peligro la vida del enfermo y hacen necesario iniciar prontamente el tratamiento. El tipo de germen involucrado ha ido modificándose con el tiempo y también varía de acuerdo a cada centro hospitalario. La mayor parte de las veces los tratamientos de antibióticos que se indican son la combinación de agentes de amplio espectro de actividad para cubrir tanto a los gérmenes Gram positivos como a los negativos.¹⁶² Algunas consideraciones importantes son, por ejemplo, la asociación de bacteremia por bacilos Gram negativos en aquellos pacientes con EICH de afectación gastrointestinal,^{163,164} y la asociación de neutropenia con infiltrados pulmonares intersticiales, en donde deben ser considerados gérmenes oportunistas poco frecuentes, como *Legionella*, *Nocardia* y *Mycobacterias*.¹⁶²

Las **infecciones fúngicas** han mostrado una disminución importante en su incidencia desde la administración preventiva de fluconazol, su uso se ha asociado a una menor incidencia de infecciones con influencia en la supervivencia global (SG) de los enfermos. El itraconazol -otro agente del mismo grupo- también es utilizado ampliamente pero sin

obtener los resultados del fluconazol.^{165,166} Por otro lado, la amfotericina B y su variedad liposomal tienen un papel muy importante en la atención de las infecciones graves.¹⁶⁵

Las infecciones por aspergillus son otras formas de infecciones micóticas. Entre los factores de riesgo para su adquisición se incluyen edad avanzada, EICH aguda y crónica, uso de esteroides y períodos largos de neutropenia.^{167,168} Usualmente se manifiestan como infecciones respiratorias bajas y sinusitis. Otras formas menos comunes de presentación incluyen los abscesos cerebrales. Como en cualquier proceso infeccioso, la detección temprana es muy importante en la evolución de los enfermos; para estos fines se han utilizado diversos métodos, desde el lavado bronquial hasta análisis más modernos, como ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)¹⁶⁹ y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).¹⁷⁰ Para su tratamiento se han utilizado medicamentos como voriconazol y posaconazol, entre otros.¹⁶⁵

La infección por pneumocystis jirovecii, especialmente la manifestada por neumonía, es prácticamente inexistente cuando el paciente trasplantado ha recibido prevención con trimetoprim, por lo que la reducción del es muy alta¹⁷¹ y en las poco comunes circunstancias de intolerancia o alergia a este medicamento, se ha sugerido el uso de dapsona o atovaquone.^{172,173}

Un capítulo muy importante de las infecciones en el paciente sometido a un TCH es el que se refiere a las **infecciones virales**, de éstas la que ocurre por el virus citomegálico es la más frecuente y relevante. Se puede presentar como una reinfección, o como una infección de novo adquirida del donante de las CH, o por medio de la transfusión de productos sanguíneos antes o después del procedimiento.¹⁷⁴ Con la introducción de la prevención para esta infección las tasas de incidencia han disminuido en gran medida. Si bien es cierto que puede cursar de manera asintomática, en otros casos puede originar neumonía o gastroenteritis graves. En el tratamiento de la neumonía por citomegalovirus, a pesar de la administración de ganciclovir y gamma globulina intravenosa la mortalidad puede llegar hasta el 50%.¹⁷⁵ Medicamentos más modernos como el foscarnet pueden ser utilizados en los casos refractarios o en aquellos en que coexista neutropenia. El cidofivir también ha sido referido como tratamiento de rescate para los casos que no responden a los medicamentos

anteriormente mencionados.^{176,177} En vista de la difícil evolución de los pacientes con infección por este virus, las medidas de prevención que incluyen la realización de estudios en los productos sanguíneos a transfundir y la depleción de linfocitos de los mismos son de gran importancia.¹⁷⁸ La determinación temprana de antígenos virales o del ADN constituyen herramientas de gran valor para la instauración temprana del tratamiento.

HISTORIA DEL TCH

Los primeros intentos por utilizar la médula ósea con fines terapéuticos se iniciaron a mitad del siglo pasado y corresponden a los estudios publicados por Jacobson *et al.*¹⁷⁹ en 1949. Estos autores demostraron primero que un ratón podría sobrevivir a la administración de dosis letales de radioterapia si se evitaba que el bazo fuera radiado; también demostraron que ocurría el mismo efecto si se inyectaban intraperitonealmente células esplénicas. Poco después, en 1951, Lorenz *et al.*¹⁸⁰ llevaron a cabo el mismo experimento pero utilizando para esos fines células de la médula ósea. En 1954 Barnes y Loutit¹⁸¹ publicaron sus resultados donde los ratones protegidos con médula singénica podían sobrevivir más allá de los cien días después de haber sido sometidos a la radiación; sin embargo, aquellos que recibían médula alogénica solo sobrevivían treinta días para después fallecer de "una enfermedad secundaria". Hasta entonces, lo anteriormente mencionado se explicaba por un "factor humoral" contenido en el producto infundido. Esta hipótesis fue dejada de lado cuando Main y Prehn,¹⁸² en 1955, a partir de sus estudios de injertos de piel y Trentin¹⁸³ después, en 1956, explicaban la permanencia de las células trasplantadas gracias a un fenómeno de tolerancia inmunológica.

Ya entonces parecía claro que la médula ósea podía ser utilizada no sólo como un factor protector de la radiación, sino que podría tener un uso clínico en el tratamiento de la leucemia, la aplasia medular y otras enfermedades de la médula ósea o del sistema linfóide. En 1956, Barnes *et al.*¹⁸⁴ refirieron el tratamiento de ratones con leucemia mediante la administración de radiación letal y después infusión de médula ósea. En Nueva York, Thomas *et al.*¹⁸⁵ habían empezado estudios para tratar pacientes terminales, publicando en 1957 sus resultados con seis enfermos que recibieron radiación letal e infusión intravenosa de médula ósea de personas sanas, en este grupo sólo un paciente presentó un injerto transitorio.

Otros investigadores obtuvieron resultados similares, de tal forma que, en 1970, Bortin¹⁸⁶ publicó una serie de más de 200 pacientes con trasplante alogénico fallido.

Por otro lado, Kurnick *et al.*¹⁸⁷ describieron, en 1958, los resultados obtenidos en dos pacientes con cáncer que recibieron radiación regional intensiva y se les administró médula ósea autóloga por vía intravenosa, la médula había sido previamente congelada, aquí un paciente mostró recuperación después de haber presentado pancitopenia moderada. En 1959, McGovern *et al.*¹⁸⁸ trataron a tres pacientes con leucemia en quienes su médula ósea fue obtenida y mantenida en congelación cuando se encontraban en remisión, los tres recibieron una dosis alta de radiación, uno de ellos obtuvo remisión. Resulta muy interesante que en 1997 se informó del caso de un paciente con linfoma que había sobrevivido a un autotrasplante con altas dosis de quimioterapia realizado 31 años antes.¹⁸⁹

Thomas *et al.*,¹⁹⁰ en 1959, describieron el caso de una mujer con leucemia terminal que recibió tratamiento con radioterapia a una dosis en que se esperaba una pancitopenia prolongada, recibiendo después la infusión de la médula ósea de una hermana gemela idéntica, la paciente se recuperó rápidamente y logró permanecer libre de leucemia durante cuatro meses; este estudio demostró dos situaciones muy importantes: la primera, que la radioterapia a dosis altas seguida de la infusión de médula ósea compatible podría tener un efecto antileucémico y, segundo, que la médula ósea compatible era capaz de restaurar la función de la médula ósea después de radiación a dosis letales. Por entonces, un par de estudios que indicaban los resultados después de la infusión de médula ósea en personas que habían estado expuestos a accidentes nucleares lograron que se incrementara el interés en esta área de la medicina.^{191,192}

Los estudios realizados en ratones por Bllingham *et al.*¹⁹³ fueron los primeros en definir las bases y, posteriormente, la descripción de la enfermedad de injerto contra huésped. Desde los años cincuenta se habían definido en ratones las características de esta enfermedad básica en el campo de los trasplantes de células hematopoyéticas. Se estableció que no ocurría en los trasplantes singénicos, que para su manifestación era necesaria la permanencia de las células trasplantadas, y que la severidad dependía mucho de las diferencias antigénicas entre donante y receptor.¹⁹³⁻¹⁹⁵ Otras investigaciones realizadas en

ratones por diferentes grupos permitieron dar a conocer, por un lado, la influencia de los factores genéticos y, por otro, los primeros indicios que demostraban que la severidad de la EICH podía ser aminorada con el uso de metotrexato.¹⁹⁶⁻¹⁹⁹

Otro capítulo muy importante de la historia de los TCH es el que se refiere a la criopreservación celular. Inicialmente se utilizó glicerol,²⁰⁰ con el cual su remoción antes de la infusión era esencial; poco después, Cavins *et al.*²⁰¹ describieron mediante estudios en perros el uso de dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotector, éste no hacía necesaria su remoción y se convirtió en una técnica estándar en el área de los trasplantes de médula ósea.

El mismo grupo²⁰² pudo demostrar, en 1964, que la capa leucocitaria obtenida de la sangre periférica autóloga en perros podía también ser capaz de regenerar la médula ósea si se infundía después de haber recibido radiación letal. A pesar del importante avance de la criopreservación, el uso generalizado de obtención de CH de sangre periférica no se estableció hasta que no mejoraron también los aspectos de la estimulación y la recolección celular.

Los estudios del Dr. Thomas y su grupo^{203,204} en el área de los trasplantes alogénicos utilizando radiación en perros demostraron los mismos problemas que después se observaron en humanos, es decir, el fracaso y el rechazo del injerto, la EICH y la muerte por infecciones oportunistas. Algunos perros lograban sobrevivir, seguramente debido a que el donante y el receptor eran lo “suficientemente” histocompatibles, en ese momento se desconocían los métodos para la adecuada selección de los donantes.

En 1960, Medawar y Burnett recibieron el premio Nobel por sus investigaciones acerca de “La Tolerancia Inmunológica Adquirida”, con el galardón se reconoció el área de los trasplantes como un campo de la ciencia.

Dausset,²⁰⁵ por un lado, y van Rood *et al.*,²⁰⁶ por otro, reconocieron que los antígenos leucocitarios humanos (HLA) seguían principios genéticos de herencia. Storb *et al.*^{207,208} llevaron a cabo estudios en perros a quienes se les administraba, después de recibir radiación a dosis letales, médula ósea de miembros de su camada. Demostraron que aun

cuando los trasplantes se realizaran entre miembros de la camada, si no eran compatibles, siempre fallaban; los injertos con compatibilidad entre donante y receptor tenían una supervivencia mucho mejor. También demostraron que la administración de metotrexato como inmunosupresor después del trasplante compatible mejoraba en más del 90% la supervivencia,²⁰⁹ dejando claro que era esencial la compatibilidad en el HLA entre receptor y donante.

A principio de la década de los años sesenta el interés en los trasplantes había disminuido mucho en vista de los malos resultados obtenidos hasta el momento; sin embargo, en esos años hubo importantes avances en el entendimiento de la importancia del HLA, en el tratamiento de los procesos infecciosos y en el área de la transfusión sanguínea.

En los niños con inmunodeficiencias congénitas, al no tener capacidad de rechazar el trasplante y, por tanto, no requerir inmunosupresión previa, fue donde se obtuvieron por primera vez muy buenos resultados en los trasplantes, siendo Gatti *et al.*,²¹⁰ en 1968, los primeros en publicar el éxito en un niño con inmunodeficiencia combinada grave; después, otros grupos publicaron también resultados excelentes.^{211,212}

El primer TCH llevado a cabo por el equipo de trasplantes del grupo del Dr. Thomas²¹³ en Seattle se practicó en 1969, se trató de una paciente con leucemia mieloide crónica en crisis blástica; así se inició uno de los programas de TCH más importantes de la historia.

El mismo grupo,²¹⁴ en 1972, refirió el primer caso de TCH en anemia aplásica. Por otro lado, Santos *et al.*²¹⁵ publicaron cuatro casos de TCH en anemia aplásica en los que el acondicionamiento consistió en administrar ciclofosfamida a dosis altas.

En 1975, el Dr. Tomas y su grupo²¹⁶ publicaron en *The New England Journal of Medicine* uno de los artículos más citados en la historia de los TCH, describía los fundamentos y los antecedentes experimentales del trasplante, incluía el tema de la histocompatibilidad, sugería la posibilidad de llevar a cabo procedimientos con donantes no emparentados y los cuidados del paciente antes y después del procedimiento. Mostraba también los resultados de 37 pacientes con anemia aplásica y 73 con leucemia donde se analizaban los datos más importantes de la mortalidad, del rechazo, de la EICH y, también, de los supervivientes.²¹⁶

En 1977 el mismo grupo publicó sus resultados con el TCH en 100 casos de leucemia²¹⁷ y ese mismo año publicaron resultados que sugerían que algunos pacientes trasplantados podían ser considerados como pacientes curados.²¹⁸

La importancia de practicar los TCH tempranamente, antes de que se presente resistencia a los medicamentos o de llegar a estadios avanzados de la enfermedad, quedó en evidencia con dos diferentes informes de pacientes con leucemia mieloblástica aguda trasplantados en primera remisión que se publicaron en 1979.^{219,220} Como era de esperarse los resultados fueron mejores, casi el 50% de ellos se podían considerar como supervivientes a largo plazo.

En 1965 Mathé acuñó el término de “inmunoterapia adaptativa”, donde refería que era posible que los linfocitos del injerto tuvieran la capacidad de reaccionar contra las células neoplásicas para ayudar a erradicar las células malignas que pudieran haber permanecido después del régimen de acondicionamiento.²²¹ Los intentos iniciales que evaluaron la posibilidad de que la EICH incluyera también cierto efecto de injerto contra tumor fueron infructuosos. Sin embargo, Weiden *et al.*,²²² al incluir más pacientes en sus estudios, fueron capaces de demostrar que, en los pacientes trasplantados por leucemia, cuando se presentaba una EICH más grave se reducían las posibilidades de recaída.

Ya en la década de los años setenta el problema de la carencia de un donante HLA compatible para casi tres terceras partes de los pacientes que requerían un TCH se convirtió en uno de los asuntos más importantes a resolver. Hansen *et al.*,²²³ en 1979, realizaron el primer TCH exitoso en un paciente con leucemia refractaria con un donante no emparentado familiarmente, por no contar con un hermano HLA idéntico; el trasplante evolucionó bien hasta que presentó recaída de la enfermedad. Este caso dio lugar a la creación del Programa Nacional de Donantes de Médula (NMDP, por sus siglas en inglés). Por esos años también se establecieron dos grupos multicéntricos de trasplantes con gran influencia hasta nuestros días, el Registro Internacional de Trasplantes de Médula Ósea (IBMTR) y el Grupo Europeo de Trasplante de Médula Ósea (EBMT).

Powles *et al.*,^{224,225} a finales de la década de los años setenta, publicaron los primeros reportes del uso de la ciclosporina en los TCH para el tratamiento y la prevención de la EICH; esta droga había sido inicialmente utilizada en los trasplantes de órganos sólidos.²²⁶ También se dieron avances muy importantes en lo referente al tratamiento y prevención de las infecciones, surgieron las primeras referencias del uso del acyclovir²²⁷ y de la amfotericin.²²⁸

A partir de los años ochenta se empezaron a reportar análisis de los resultados obtenidos en los aspectos más importantes de los TCH en grupos de pacientes cada vez más grandes, gracias a la expansión de diferentes programas de trasplantes. Se introdujo el ganciclovir para el tratamiento de la infección por citomegalovirus,²²⁹ y la amfotericina liposomal con la que se refería mucha menor toxicidad renal que con la convencional.²³⁰

Por otro lado, se establecieron diferentes agrupaciones donde se almacenaban bases de datos con donantes voluntarios de médula ósea: el Grupo de Investigación Anthony Nolan en Londres, Eurodonor con base en Leiden –Holanda-, y la versión norteamericana, el NAMDP.²³¹

Los primeros intentos por manipular el injerto consistieron en producir la depleción de linfocitos T del producto a transfundir con la intención de disminuir la posibilidad de desarrollar EICH; sin embargo, esta maniobra se relacionó también con un aumento en la tasa de rechazos y recaídas (222).²²²

Se dieron también importantes avances en el campo de los TCH autólogos para diversas enfermedades.^{232,233} Además, se inició la publicación de trasplantes obteniendo las CH de sangre periférica,²³⁴ así como el intento de maniobras de purgado de células malignas por medio de diferentes técnicas.²³⁵

En el inicio de la década de los noventa se publicaron los primeros estudios sobre el uso de factores estimulantes de colonias en el campo de los TCH,²³⁶ al acelerar la recuperación de los neutrófilos se acortaba la estancia hospitalaria. La utilización de estos factores para movilizar las células hematopoyéticas a la sangre periférica y recolectarlas por aféresis hizo posible que la recuperación hematológica fuera más rápida, con la consiguiente mejoría en las tasas de morbilidad y mortalidad. La simplificación del proceso permitió

pensar en llevar a cabo procedimientos de este tipo de manera ambulatoria; por ello, la recolección de CH de sangre periférica prácticamente desplazó a la médula ósea como fuente de estas células en los autotrasplantes.²³⁷

Por otro lado, en 1989 se publicó el primer TCH exitoso con células obtenidas de la sangre del cordón umbilical.²³⁸ A partir de aquí, el número de trasplantes con esta fuente se incrementó de manera muy importante; sin embargo, la mayor parte de los procedimientos se llevaban a cabo en pacientes pediátricos de bajo peso ya que el principal problema de esta fuente era la reducida cantidad de CH que contenía cada unidad, generando con ello un prendimiento retardado. También quedó claro que el riesgo para desarrollar EICH con esta modalidad de TCH se reducía en gran medida; por esta razón, el incremento de los trasplantes y también el de los bancos públicos y privados creados para el almacenamiento de estas unidades en muchas partes del mundo fue muy importante.^{239,240}

En los años noventa se publicaron diferentes informes que referían cambios en el entendimiento de la patogénesis de la EICH y que provocaron, a su vez, modificar la forma de prevenirla o tratarla. En este sentido, se produjo un cambio en el manejo ya conocido de la inmunosupresión hacia la inducción de la tolerancia específica, iniciándose así el uso de los anticuerpos monoclonales^{241,242} y también de los anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral.²⁴³

En 1996, Barrett y Malkovska²⁴⁴ publicaron una revisión sobre el efecto “injerto contra leucemia” que se venía investigando desde los años ochenta; en la actualidad es algo aceptado por todos. De hecho, los TCH donde se utilizan regímenes de acondicionamiento no mieloablativos, practicados ahora en todo el mundo, basan gran parte de sus buenos resultados más en la eficacia de este efecto de injerto contra tumor que en la erradicación de la enfermedad por el régimen de acondicionamiento utilizado. Una de las principales ventajas de estos trasplantes es la posibilidad de llevarlos a cabo en personas de mayor edad, o en aquellas en que sus condiciones generales les impedirían un TCH convencional.^{14,245}

La terapia génica tiene potencialmente también muchas aplicaciones en el campo de los TCH corrigiendo enfermedades genéticas y actuando de diferentes maneras que continúan siendo estudiadas.^{246,247}

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

Un avance importante en el ámbito del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos ha sido el empleo de fuentes de células progenitoras diferentes a la médula ósea. La utilización de acondicionamientos no mieloablativos ha emergido como una atractiva alternativa al acondicionamiento tradicional del trasplante hematopoyético, en un intento de disminuir la morbilidad en estos pacientes.

La experiencia inicial se ha desarrollado en pacientes adultos pero también es una opción en niños.

Otro punto de extraordinario interés para países como el nuestro, es que estos regímenes de acondicionamiento producirían una menor morbilidad que impactaría en el coste económico de este procedimiento, haciéndolo más asequible a los pacientes de nuestro país. Por tanto, se hace necesario llevar a cabo estudios que comprueben la posibilidad de desarrollar regímenes no mieloablativos en el trasplante hematopoyético en niños mexicanos.

OBJETIVOS

PRIMERO. Analizar las características clínicas y la supervivencia de los pacientes sometidos a trasplante con acondicionamiento no mieloablativo en pediatría mediante la revisión de las publicaciones del autor en este ámbito.

SEGUNDO. Comprobar la viabilidad del trasplante hematopoyético con acondicionamientos no mieloablativos en un país en vías de desarrollo.

RESULTADOS

ÍNDICE DE RESULTADOS

Publicación 1. González-Llano O, Mancías-Guerra C, Cantú-Rodríguez OG, Hernández-Garza NE, Quiroga-Rivera A, Herrera-Garza JL, Jaime-Pérez JC, Gómez-Almaguer D. Bone marrow transplantation in a child with hemophagocytic lymphohistiocytosis using a less toxic conditioning regimen. *Arch Med Res* 1999;30:338–340. Case Report.

Traducción de la Publicación 1.

Publicación 2. Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Argüelles A, González-Llano O, Cantu OE, Hernández NE. Hematopoietic stem cell allografts using a non-myeloablative conditioning regimen can be safely performed on an outpatient basis: report of four cases. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:131–133.

Traducción de la Publicación 2.

Publicación 3. Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles GJ, Tarín-Arzaga LC, González-Llano O, Jaime-Pérez JC, López-Martínez B, Cantú-Rodríguez OG, Herrera-Garza JL. Reduced-intensity stem cell transplantation in children and adolescents: the Mexican experience. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9:157-161.

Traducción de la Publicación 3.

Publicación 4. Gonzalez-Llano O, Jaime-Pérez J, Cantu-Rodríguez O, Mancias-Guerra C, Gutierrez-Aguirre H, Herrera-Garza J, Gomez-Almaguer D. Successful father-to-son stem cell transplantation in a child with hemophagocytic lymphohistiocytosis using a reduced-intensity conditioning regimen. *Eur J Haematol* 2006;77:341-344. Case Report.

Traducción de la Publicación 4.

Publicación 5. Cantú-Rodríguez OG, Jaime-Pérez JC, Gutiérrez-Aguirre CH, González-Llano O, Mancías-Guerra C, Tarín-Arzaga LC, Ruiz-Delgado GJ, Sandoval-Villa CC, Marfil-Rivera J, Morales-Toquero A, Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Almaguer D. Outpatient allografting using non-myeloablative conditioning: the Mexican experience. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:119–123.

Traducción de la Publicación 5.

Publicación 6. Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles GJ, Tarín-Arzaga LC, González-Llano O, Gutiérrez-Aguirre H, Cantú-Rodríguez O, Jaime-Pérez J, Carrasco-Yalán A, Giral S. Alemtuzumab for the Treatment of Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:10-15.

Traducción de la Publicación 6.

Publicación 7. Gonzalez Llano O, Jaime Perez JC, Cantu Rodriguez O, Mancias Guerra C, Gutiérrez Aguirre H, Herrera Garza JL, Rodriguez-Romo L, Gomez Almaguer D. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using a reduced-

intensity conditioning regimen in infants: experience at a single institution in Mexico. *Pediatr Hematol Oncol* 2008;25:39–47.

Traducción de la Publicación 7.

Publicación 8. Rodríguez-Romo L, Mancías-Guerra C, González-Llano O, Jaime-Pérez JC, Martínez-Cabriales S, García-Rodríguez F, Gómez-Almaguer D. Outpatient reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia in children. *Br J Haematol* 2010;151:200–202.

Traducción de la Publicación 8.

Publicación 9. Ruiz-Delgado GJ, Mancías-Guerra C, Macías-Gallardo J, Gonzalez-Llano O, Hernandez-Arizpe A, Rodriguez-Romo LN, Martinez-Cabriales SA, Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles GJ. Long-term results of placental blood allografting using reduced-intensity conditioning: multicenter experience in a developing country. *Hematology* 2011; 16:155-159.

Traducción de la Publicación 9.

Publicación 10. González-Llano O, Rodríguez-Romo LN, Mancías-Guerra MC, Tarín-Arzaga L, Jaime-Pérez JC, Herrera-Garza JL, Graciela Cantú-Rodríguez O, Gutiérrez-Aguirre CH, García-Sepúlveda RD, García-Marín AY, Villarreal-Martínez L, Salazar-Riojas MR, Gómez-Almaguer D. Feasibility of an outpatient HLA haploidentical stem cell transplantation program in children using a reduced-intensity conditioning regimen and CD3–CD19 depletion. *Hematology* 2014;19:10-17.

Traducción de la Publicación 10.

CASE REPORT

Bone Marrow Transplantation in a Child with Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Using a Less Toxic Conditioning Regimen

Oscar González-Llano, Consuelo Mancías-Guerra, Olga G. Cantú-Rodríguez, Nora Elsa Hernández-Garza, Aquiles Quiroga-Rivera, José Luis Herrera-Garza, José Carlos Jaime-Pérez, and David Gómez-Almaguer

Servicio de Hematología y Departamento de Pediatría, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico

Received for publication January 13, 1999; accepted May 17, 1999 (98/004).

Background. Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) is a rare non-neoplastic, frequently fatal disease of childhood. HLA-matched bone marrow transplantation (BMT) can bring about long-term remission and an eventual cure.

Methods. We report on the beneficial effect of BMT in a 2-month-old male using a less intensive conditioning regimen. The regimen included busulfan at 4 mg/kg/day (total dose 16 mg/kg), etoposide at 300 mg/m²/day (total dose 900 mg/m²), and cyclophosphamide at 50 mg/kg/day (total dose 150 mg/kg). Prophylaxis for graft-vs.-host disease included methotrexate and cyclosporine.

Results. An absolute neutrophil count of 500 μ L was noticed on +day 12 (engraftment day). At present, i.e., 400 days after the procedure, the patient is asymptomatic, his physical examination is normal, and a slightly increased level of gamma-glutamyl-transpeptidase (GGT) and alkaline phosphatase are the only laboratory abnormalities.

Conclusions. In this case, the conditioning regimen was adequate for the eradication of the disease and allowed persistent engraftment without significant toxicity. The results in our patient suggest that a less toxic regimen is feasible and permits rapid engraftment without compromising the effectiveness of chemotherapy. © 1999 IMSS. Published by Elsevier Science Inc.

Key Words: Lymphohistiocytosis, Hemophagocytic, Transplant, Bone marrow, Chemotherapy.

Introduction

Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) is a rare non-neoplastic, frequently fatal disease of childhood (1). It has been divided into two categories, familial and secondary, but the distinction between the forms is not easily made (2). Clinical features including high fever, hepatosplenomegaly, and several neurological manifestations associated with pancytopenia, hypertriglyceridemia, hypofibrinogenemia, elevated liver enzymes, and hyperferritinemia are seen mainly in small children (3). HLH is considered a defect in immunomodulation, characterized by a benign, generalized lymphocytic and histiocytic proliferation associated with

hypercytokinemia (4). The use of etoposide, steroids, and intrathecal methotrexate has led to remission in some patients; nevertheless, most patients still relapse and ultimately die from the disease (5,6). HLA-matched bone marrow transplantation (BMT) can bring about long-term remission (7–9). In the majority of patients, the transplant conditioning regimen consisted of busulfan, cyclophosphamide, and etoposide, which was well tolerated but accompanied by relevant toxicity, mainly severe oral mucositis. We report the beneficial effect of BMT in one patient, using a less toxic conditioning regimen.

Materials and Methods

A 2-month-old male, the third child of unrelated parents, was admitted with a history of 7 days of fever, abdominal

Address reprint requests to: Dr. Oscar González Llano, Falcón 909, Cumbres 2° sector, 64610 Monterrey, Nuevo León, México. Tel.: (+52) (8) 348-6136 and 348-8510; Fax: (+52) (8) 348-6136.

distention, and jaundice. The physical examination showed an enlarged liver and spleen, 6 and 4 cm below the costal margin, respectively. Hemoglobin concentration was 78 g/L, total neutrophils $0.75 \times 10^9/L$, and the platelet count, $91 \times 10^9/L$. Increases in direct bilirubin (82 $\mu\text{mol/L}$), lactic dehydrogenase (660 IU), triglycerides (3.3 mmol/L), and decreased fibrinogen of 1.16 g/L were reported. The search for syphilis, toxoplasma, rubella, herpes, cytomegalovirus, and Epstein Barr virus was negative. The cerebrospinal fluid showed 15 mononuclear cells and hemophagocytosis was detected in the bone marrow, establishing the diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis.

The patient was given etoposide (150 mg/m²/day) for 3 consecutive days and dexamethasone (0.3 mg/kg/day) on 7 consecutive days, in addition to intrathecal methotrexate. Four weeks later, the patient was in complete remission, the physical examination was normal, and all of the altered laboratory studies had returned to normal limits. Cyclosporine at 5 mg/kg/day was initiated.

Three months later, allogeneic BMT was performed. The donor was the patient's healthy 8-year-old, HLA-identically-matched sister. The conditioning regimen included busulfan (4 mg/kg/days -8, -7, -6, and -5), etoposide (300 mg/m²/day on days -3 and -2), and cyclophosphamide (50 mg/kg/day on days -4, -3, and -2). The number of nucleated cells infused was $4 \times 10^8/\text{kg}$ body weight of the recipient. Prophylactics for graft-vs.-host disease included methotrexate (10 mg/m² on days +3, +5, and +11), and cyclosporine 2 mg/kg twice per day i.v. Intravenous gamma globulin (65 mg/kg every 3 weeks until day +100) was used. An absolute neutrophil count of 500/uL was noted on day +12, the last day of platelet transfusion was day +14, and the patient was discharged on day +16.

Manifestations of GVHD in skin and liver were noticed on day +80 and required oral prednisone for its control. At present (day +400), the patient is asymptomatic, his physical examination is normal, and slightly increased GGT and alkaline phosphatase are the only laboratory abnormalities.

Discussion

In the treatment of HLH, long-term remissions have been obtained with the use of systemic and intrathecal chemotherapy (5,6). However, most children treated with etoposide and steroids eventually relapse and die of the disease (7,10,11). Therefore, the use of allogeneic BMT appears to be a logical approach to the treatment of HLH regardless of whether excessive macrophage activation is intrinsic or secondary to T-cell activation. A recent report from the International HLH Registry cited an estimated 5-year survival rate of 68% after matched sibling transplantation, compared with 10.1% for patients treated solely with chemotherapy ($p = 0.0001$) (12).

In the majority of patients, the transplant conditioning

regimen has consisted of oral busulfan at 4 mg/kg/day (total dose 16 mg/kg), intravenous cyclophosphamide at 50 mg/kg/day (total dose 200 mg/kg), and intravenous etoposide at 500 mg/m²/day (total dose 1,500 mg/m²) (7,9,13–16). This regimen has been well tolerated, but relevant toxicity, mainly severe oral mucositis has been reported without excessive incidence of transplant-related mortality. Some patients have also received intravenous ATG and aracytine (8,9). In some cases, toxicity was reduced by decreasing the etoposide dose from 1,500–900 mg/m² (300 mg/m²/day) (9). The case reported here, the transplant conditioning regimen consisted of the same dose of oral busulfan, but reduced doses of cyclophosphamide (150 mg/kg) and etoposide (600 mg/m²). This regimen was adequate for the eradication of the disease and allowed persistent engraftment without significant toxicity. High doses of busulfan associated with cyclophosphamide have strong myeloablative and immunosuppressive effects. The inclusion of etoposide provides a third drug known to be effective in the treatment of HLH.

It is not always necessary to administer very high and potentially toxic doses of chemotherapy to eradicate the disease. In adults with leukemia, the use of cyclophosphamide at a dose of 120 mg/kg instead of 200 mg/kg did not compromise the antileukemic activity of the original regimen and markedly reduced the complication rate (17). Recently, the use of non-myeloablative stem cell transplantation has been successfully attempted as an alternative to conventional BMT with lethal cytoablation for the treatment of malignant and non-malignant hematological diseases (18). The results in our patient suggest that a less toxic regimen permits a rapid engraftment of the donor stem cells without compromising the effectiveness of the chemotherapy. Fewer myeloablative or non-ablative regimens may also help bypass frequent late complications that result from the combined effects of high doses of chemotherapy in addition to prior conventional treatments. In the low-age group, allogeneic minus myeloablative BMT may reduce the incidence of growth retardation and infertility due to the unique sensitivity to chemoradiotherapy of the growth centers of the bones, gonads, and testicles. The use of non-myeloablative BMT should be attempted in HLH to reduce the morbidity and mortality related to this modality of treatment.

References

1. Janka GE. Familial haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Eur J Pediatr* 1983;140:221.
2. Henter JI, Elinder G, Ost A. FHL Study Group of the Histiocyte Society. Diagnostic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Semin Oncol* 1991;18:29.
3. Imashuku S, Hibi S, Todo S. Haemophagocytic lymphohistiocytosis in infancy and childhood. *J Pediatr* 1997;130:352.
4. Filipovich AH. Haemophagocytic lymphohistiocytosis: a lethal disorder of immune regulation. *J Pediatr* 1997;130:337.
5. Ambruso DR, Hays T, Zwartzes WJ, Tubergen DG, Favara BE. Suc-

- cessful treatment of lymphohistiocytic reticulosis with phagocytosis with epipodophyllotoxin VP-16-123. *Cancer* 1980;45:2516.
6. Fisher A, Virelizer JL, Arenzana-Seisdedos F. Treatment of four patients with erythrophagocytic lymphohistiocytosis by a combination of VP-16-213, steroids, intrathecal methotrexate, and cranial irradiation. *Pediatrics* 1985;76:263.
 7. Fisher A, Cerf-Bensussan N, Blanche S, LeDeist F, Bernard-Oury C, Leverger MD, Schaison G, Durandy A, Griscelli C. Allogenic bone marrow transplantation for erythrophagocytic lymphohistiocytosis. *J Pediatr* 1986;108:267.
 8. Blanche S, Caniglia M, Girault D, Landman J, Griscelli C, Fisher A. Treatment of haemophagocytic lymphohistiocytosis with chemotherapy and bone marrow transplantation. A single center study of 22 cases. *Blood* 1991;78:51.
 9. Baker KS, DeLaat CA, Steinbuch M, Gross TG, Shapiro RS, Loechelt B, Harris R, Filipovich A. Successful correction of haemophagocytic lymphohistiocytosis with related or unrelated bone marrow transplantation. *Blood* 1997;89:3857.
 10. Nezelof C. Hemophagocytic lymphohistiocytosis as a syndrome correlation of clinicopathological data. *Pediatr Hematol Oncol* 1989;6:207.
 11. Hansmann ML, Rontogianni D, Janka-Schaub GE. Familial haemophagocytic lymphohistiocytosis macrophages showing immunohistochemical properties of activated macrophages and T-accessory cells. *Pediatr Hematol Oncol* 1989;6:237.
 12. Arico M, Janka C, Fisher A, Henter JI, Blanche S, Elinder G. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: report of 122 children from the international registry. *Leukemia* 1996;10:197.
 13. Blanche S, Caniglia M, Fisher A, Griscelli C. Treatment of familial lymphohistiocytosis: chemotherapy or bone marrow transplant? *Pediatr Hematol Oncol* 1989;6:273.
 14. Nespoli L, Locatelli F, Bonetti F, Porta F, Zecca M, Gibardi A, Gambarana D, Vitale V, Burgio GR, Severi F. Familial haemophagocytic treated with allogenic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1991;7(Suppl 3):139.
 15. Bolme P, Henter J-I, Winiarski J, Elinder G, Ljungam P, Lönnnerholm G, Ringdén O. Allogenic bone marrow transplantation for hemophagocytic lymphohistiocytosis in Sweden. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:331.
 16. Filipovich AH, Jyonouchi H, Loechelt B, Kamat D, Dusenberry K, Ramsay N, Kersey J, Shapiro RS. Non-sibling bone marrow transplantation for congenital disorders associated with lethal hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 1992;80(Suppl 1):333.
 17. Tustschka PJ, Copelan EA, Klein JP. Bone marrow transplantation for leukemia following a new busulfan and cyclophosphamide regimen. *Blood* 1987;70:1382.
 18. Shimon S, Arnon N, Ella N, Amiram E, Reuven O. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 1998;90:756.

PUBLICACIÓN 1 - TRADUCCIÓN

Trasplante de médula ósea en un niño con linfohistiocitosis hemofagocítica empleando un régimen de acondicionamiento menos tóxico.

González-Llano O, Mancías-Guerra C, Cantú-Rodríguez OG, Hernández-Garza NE, Quiroga-Rivera A, Herrera-Garza JL, Jaime-Pérez JC, Gómez-Almaguer D.

Archives of Medical Research 1999;30:338-340. Case Report.

Resumen

Antecedentes. La linfohistiocitosis hemofagocítica (LHH) es una enfermedad rara de origen no neoplásico y frecuentemente fatal que ocurre en niños. El trasplante de médula ósea (TMO) de un donante HLA compatible puede lograr la remisión y, eventualmente, la curación de la enfermedad.

Métodos. Comunicamos el efecto benéfico en un paciente varón de dos meses de edad sometido a un TMO con un régimen de acondicionamiento menos tóxico, que consistió en: busulfan a 4mg/kg/al día (dosis total de 16 mg/Kg), etopósido a 300 mg/m²/día (dosis total de 900 mg/m²) y ciclofosfamida a 50 mg/Kg/día (dosis total de 150 mg/Kg). Como tratamiento profiláctico para la enfermedad injerto contra huésped se administró metotrexato y ciclosporina.

Resultados. El recuento absoluto de neutrófilos de 500/μL en el día +12. Actualmente, 400 días después del procedimiento, el paciente se encuentra asintomático, su examen físico es normal y, como únicas anomalías de laboratorio, presenta un leve aumento de gamma-glutamyl-transpeptidasa (GGT) y fosfatasa alcalina.

Conclusiones. En este caso, el régimen de acondicionamiento fue adecuado para erradicar la enfermedad y conseguir la persistencia del injerto sin presentar toxicidad significativa. Los resultados en nuestro paciente sugieren que un régimen menos tóxico es factible y permite un rápido prendimiento sin comprometer la efectividad de la quimioterapia.

Introducción

La linfohistiocitosis hemofagocítica (LHH) es una rara enfermedad de origen no neoplásico que ocurre en niños y que frecuentemente es fatal [1]. Se distinguen dos variedades, familiar y secundaria, aunque identificar cada una de ellas no es tarea sencilla [2]. Los aspectos más frecuentes en esta enfermedad son la presencia de fiebre elevada, hepatoesplenomegalia, manifestaciones neurológicas, pancitopenia, hipertrigliceridemia, hipofibrinogenemia, elevación de las enzimas hepáticas e hiperferritinemia, manifestaciones que usualmente se presentan en niños menores de dos años [3].

La LHH está considerada como un desorden de inmunomodulación y se caracteriza por una proliferación benigna y generalizada de linfocitos e histiocitos asociada a un estado de hipercitoquinemia [4]. La combinación de etopósido, esteroides y metotrexato intratecal han podido lograr remisiones en algunos enfermos; sin embargo, muchos de ellos recaen y mueren más adelante [5,6]. El trasplante de médula ósea (TMO) puede lograr remisiones prolongadas [7-9]. La mayor parte de los pacientes trasplantados reciben como régimen de acondicionamiento la combinación de busulfan, ciclofosfamida y etopósido, este régimen produce toxicidad importante especialmente mucositis oral grave.

Materiales y Métodos

Un lactante menor de dos meses de edad, de padres no consanguíneos llegó al hospital con una historia de siete días de fiebre, distensión abdominal e ictericia, el examen físico demostró hepatoesplenomegalia. La analítica mostró pancitopenia, hiperbilirrubinemia, elevación de triglicéridos y deshidrogenasa láctica e hipofibrinogenemia, el aspirado de médula ósea mostró hemofagocitosis por lo que se estableció el diagnóstico de LHH. Se inició tratamiento con etopósido, dexametasona y metotrexato intratecal, cuatro semanas después el paciente se encontraba en remisión completa. Tres meses después se llevó a cabo un TMO, el donante de las CH fue su hermana mayor, una niña de 8 años de edad sana y con idéntico HLA. Se utilizó un régimen de acondicionamiento que incluyó, busulfan a una dosis total de 4 mg/Kg/día durante cuatro días, ciclofosfamida a 50 mg/Kg/día durante tres días y etopósido a 300 mg/Kg/día durante dos días. Las CH fueron obtenidas de la médula ósea de la donante y se inyectaron 4×10^8 células nucleadas/Kg de

peso del paciente. La prevención de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) se realizó con ciclosporina y tres dosis de metotrexato. El recuento de neutrófilos fue de 500/ μ L en el día +12 y la última transfusión de plaquetas fue en el día +14; el paciente fue egresado en el día +16.

Se detectó EICH en piel e hígado en el día +80 que respondió favorablemente al tratamiento con prednisona. A los 400 días después del TMO, el paciente estaba asintomático, con un examen físico normal y un aumento discreto de la fosfatasa alcalina y de la gamma glutamil traspeptidasa.

Discusión

A pesar de que el tratamiento con quimioterapia sistémica e intratecal para la LHH puede dar lugar a remisiones prolongadas [5,6], el paciente recae y finalmente muere de LHH [7,10, 11]. En los datos presentados por el Registro Internacional de LHH, la supervivencia a 5 años era del 68% para los pacientes que recibían un TMO de un hermano HLA idéntico, frente al 10.1 % en los pacientes atendidos solo con quimioterapia [12].

La mayor parte de la experiencia del TMO en LHH se refiere a regímenes de acondicionamiento donde se utilizaban dosis totales de 16 mg/Kg de busulfan, 200 mg/Kg. de ciclofosfamida y 1500 mg/Kg. de etopósido [7, 9, 13-16], con este tipo de regímenes se observó toxicidad principalmente manifestada como mucositis oral grave, pero sin observarse una alta mortalidad relacionada con el trasplante. Hay publicaciones donde se redujo la dosis de etopósido de 1500 a 900 mg/Kg como dosis total [9]. En nuestro paciente, se utilizó la misma dosis referida de busulfan, pero se redujo a 150 mg/Kg la ciclofosfamida y a 600 mg/Kg el etopósido, como dosis totales. Este tratamiento erradicó la enfermedad de base y también permitió un prendimiento persistente sin una toxicidad significativa.

No parece necesario utilizar siempre dosis muy altas de quimioterapia para erradicar la enfermedad de base con agentes potencialmente tóxicos. Además, recientemente ha sido publicado el éxito al emplear TMO con regímenes de acondicionamiento no mieloablativos, en vez de los regímenes clásicos, para el tratamiento de enfermedades hematológicas malignas y no malignas [18].

Los resultados de nuestro paciente sugieren que un régimen menos tóxico puede permitir un rápido prendimiento sin afectar la efectividad de la quimioterapia. Regímenes de acondicionamiento no mieloablativos, o menos mieloablativos, pueden también ayudar a reducir las complicaciones que ocurren por la combinación de las dosis altas de los regímenes mieloablativos convencionales, con la toxicidad secundaria a los tratamientos de quimioterapia administrados antes del TMO. En niños pequeños, un TMO con un acondicionamiento menos mieloablativo puede reducir la incidencia tanto del retardo en el crecimiento como de la infertilidad, que ocurren debido a la alta sensibilidad a la quimioterapia y a la radioterapia de las gónadas y huesos de los niños de esta edad.

El empleo de TMO con regímenes no mieloablativos debe ser intentado en los niños con LHH para reducir la morbilidad y mortalidad relacionada con este tipo de tratamiento.



Hematopoietic stem cell allografts using a non-myeloablative conditioning regimen can be safely performed on an outpatient basis: report of four cases

D Gómez-Almaguer¹, GJ Ruiz-Argüelles^{2,3}, A Ruiz-Argüelles³, O González-Llano¹, OE Cantú¹ and NE Hernández¹

¹Hospital Universitario de Monterrey; ²Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla; and ³Laboratorios Clínicos de Puebla, Puebla, Mexico

Summary:

Using a non-myeloablative, immunosuppressive, fludarabine-based conditioning regimen, we performed allogeneic peripheral blood stem cell transplants totally on an outpatient basis in four patients (two with chronic myelogenous leukemia, one with acute myelogenous leukemia and one with thalassemia major). The median granulocyte recovery time to $0.5 \times 10^9/l$ was 10 days and the lowest absolute neutrophil count was $0.064 \times 10^9/l$; only one patient developed thrombocytopenia below $20 \times 10^9/l$. No patient required red blood cell transfusions and one was given a single prophylactic platelet transfusion. All patients are alive at 210–390 (median 285) days and have definite evidence of chimerism; one developed biopsy-proven GVHD on day 50, with a limited cutaneous rash. The procedure is less costly than its counterpart using myeloablative conditioning regimens and may represent another approach in the management of patients requiring an allogeneic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplantation* (2000) 25, 131–133.

Keywords: outpatient; BMT; allogeneic; non-myeloablative

Novel allotransplant approaches are based on the concept that current intensive and toxic cytoreductive conditioning therapy can be replaced by non-myelotoxic immunosuppression and that HSC allografts create their own marrow space through GVHD reactions that, in addition, are responsible for the control of certain hematological malignancies. Accordingly, immunosuppression is directed against host cells before transplant and against host and donor cells after transplant; the net effect is the establishment of mutual graft–host tolerance that manifests itself as stable mixed donor–host hematopoietic chimerism.¹ Some investigators have undertaken approaches to reduce regimen-related toxicities.^{2–4}

Since we have been interested in modifying autologous and allogeneic HSC transplants in order to make them more affordable and available to a larger number of patients,^{5–7} we engaged in a prospective study to assess the feasibility of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation on an outpatient basis using a non-myeloablative preparative regimen.

Materials and methods

Patients and donors

Table 1 shows some of the patients characteristics; those with hematological malignancies had received prior chemotherapy and had a Karnofsky score of 100% when the procedure was performed. The donor was an HLA-identical sibling in all instances. Institutional review board approval and written consent was obtained from all the patients.

HSC mobilization and apheresis

G-CSF (10 mg/kg/day) was delivered to the donor on days –5 to +2. The apheresis procedures were performed on days 0, +1 and +2 by means of a Haemonetics V-50 PLUS machine (Haemonetics Corporation, Braintree, MA, USA) or a Baxter C-3000 PLUS machine (Baxter Healthcare, Deerfield, IL, USA), using the Spin-Nebraska protocol.⁸ The endpoint of collection was the processing of 5000 ml of blood/m² in each of the three apheresis procedures.^{5,7}

Two immunological barriers must be overcome to successfully establish hematopoietic stem cell (HSC) allografts. One is host-versus-graft disease (HVGD/rejection) and the other is the opposite, graft-versus-host disease (GVHD). Traditionally, the therapeutic regimens administered to prevent HVGD are delivered before transplant and aimed at eradicating the host's immune response as completely as possible, whereas therapeutic regimens to prevent GVHD focus on the grafted donor immune cells, are delivered after transplant and ideally, should only affect those donor immune cells that react with alloantigens for which the donor and host are mismatched.¹ Prevention of HVGD by high-dose conditioning therapy has, as a second goal, the destruction of the patient's underlying disease.

Table 1 Salient features of the allografted patients

Patient No.	Age Sex	Diagnosis	Time to achieve $\times 10^9/l$		aGVHD	Chimerism	Current status, time in days
			>0.5 gran	>20 plt			
1	15 F	Thalassemia	9 d	0*	(-)	ABO	Alive, 340
2	44 M	Ph CML	10 d	0*	(-)	ABO, XY	Alive, 270
3	54 M	Ph CML	8 d	15 d	(-)	XY	Alive, 235
4	14 M	M2 AML	12 d	0*	(-)	HLA	Alive, 170

Gran = granulocytes; plt = platelets; d = days; aGVHD = acute graft-versus-host disease; F = female; M = male; Ph = Philadelphia chromosome; CML = chronic myelogenous leukemia; AML = acute myeloblastic leukemia; * = patient never developed $<20 \times 10^9/l$ platelets.

Conditioning and grafting

A modification of the conditioning regimens used by Giralt *et al*² and Slavin *et al*³ was used: oral busulphan, 4 mg/kg was delivered on days -6 and -5; i.v. cyclophosphamide, 350 mg/m² on days -4, -3 and -2; i.v. fludarabine, 30 mg/m² on days -4, -3 and -2; i.v. cyclosporin A (CsA) 2.5 mg/kg on days -1, 0, +1, +2 and +3 and i.v. methotrexate 5 mg/m² on days +1, +3, +5 and +11. Oral CsA 5 mg/kg/day was begun on day 4 and continued to day 100, with adjustments according to serum CsA; it was then tapered over 30–60 days. Ondansetron (1 mg i.v. every hour during 4 h after i.v. chemotherapy), ciprofloxacin (250 mg twice a day) and itraconazole (100 mg twice a day) were used in all patients; antibiotics and antimycotics were used until more than 500 granulocytes/ μ l were present. When either patient or donor had anti-cytomegalovirus antibodies, patients were given oral ganciclovir (250 mg three times a day) for 100 days. The products of the PBSC apheresis were reinfused in the outpatient setting on days 0, 1 and 2.

Apheresis product studies

Enumeration of the total white blood, mononuclear (MNC) and CD34-positive cells was done by flow cytometry⁹ in an EPICS Elite ESP apparatus (Coulter Electronics, Hi-leah, FL, USA), using the anti-CD34 monoclonal antibody HPCA-2¹⁰ (Becton Dickinson, San José, CA, USA).¹⁰ No purging procedures were performed.

Chimerism studies

In cases 2 and 3 a sex mismatch was present; accordingly, a fluorescent *in situ* hybridization technique to demonstrate the X and Y chromosomes¹¹ was performed on days 50 and 60 after the infusion of the apheresis products: 100% of the white cells were from the donor. In cases 1 and 2 ABO system mismatches were present; in order to assess chimerism, a flow cytometry-based approach was used: on day 60, 30 and 49%, respectively, of the red blood cells were from the donor. In case 4, the HLA antigen Cw2, present in the donor and absent in the recipient, was found in 80% of the white cells on day 60.

Results

A median of 11.6×10^8 MNC cells/kg were transfused (range 6.2–17), with a median of 6.1×10^6 CD34 cells/kg (range 5.0–7.1); T cells were not enumerated. The granulocyte recovery times to $>0.5 \times 10^9/l$ were 9, 10, 8 and 12 days, respectively. The lowest absolute neutrophil counts were 0.405, 0.392, 0.522 and $0.064 \times 10^9/l$ granulocytes respectively. One patient developed thrombocytopenia below $20 \times 10^9/l$; the lowest platelet counts were 21, 29, 2 and $20 \times 10^9/l$ platelets, respectively. No patient required red blood cell transfusions and one (patient 3) was given a single prophylactic platelet transfusion. No patient developed febrile neutropenia, veno-occlusive disease, mucositis, severe nausea or diarrhea which would have resulted in hospital admission. All patients are alive at a median of 285 days and have definite evidence of chimerism. Patient number 2 developed biopsy-proven GVHD on day 50, with a limited cutaneous rash that responded to 25 mg/day prednisone. The patient with homozygous beta thalassemia was transplanted from a sibling heterozygous for thalassemia, and has recovered red blood cell counts, remaining transfusion-independent for more than 11 months; she has laboratory data consistent with a heterozygous state for thalassemia. The two patients with CML remain in sustained hematological remission, without detectable Ph chromosomes or BCR/ABL fusion transcripts. Patient number 4 had an hyperleukocytic ($468 \times 10^9/l$) M2-AML and had achieved a complete remission after three courses of chemotherapy (two courses of daunorubicin/cytarabine and one course of high-dose cytarabine).

Discussion

HSC transplantation has evolved significantly in the past years;^{12–14} simplification of the procedures has resulted in the possibility of performing autologous HSC transplantations on an outpatients basis.^{7,14,15} We have been able successfully to perform HSC allogeneic allografts on an outpatient basis using a non-myeloablative conditioning regimen based on two therapeutic regimens with previously proven efficacy.^{2,3}

The major goal of studies that have been reported on allogeneic HSC transplantations using non-myeloablative

conditioning regimens is to induce a graft-versus-leukemia (GVL) effect and, as a result, GVHD has been seen in a number of patients.¹⁻⁴ The median approximate cost of the full outpatient procedure in the four cases was 18 000 USD, a figure lower than that for allogeneic transplants using the conventional myeloablative conditioning regimens both in our previous experience in México: 20 000 USD⁶ and that of others in the United States: 300 000 USD.¹³

We have been interested in changes in the therapeutic approaches to hematological malignancies that may result in both simplification and reduction of costs of the procedures: accordingly, we have shown that the chemotherapy-induced hypoplasia required in the treatment of patients with acute myelogenous leukemia can be safely supported on an outpatient basis,¹⁶ that all-*trans* retinoic acid in patients with promyelocytic leukemia can be safely delivered on an outpatient basis¹⁷ and that autologous stem cell transplantation can also be performed successfully on an outpatient basis.⁷ We have now shown that allogeneic stem cell transplantation can be performed safely on an outpatient basis. It must be stressed that the outpatient transplant program cannot be offered to all patients requiring a stem cell transplantation; only those asymptomatic, fully active, able to stay in their homes, with relatives or friends or in nearby hotels, and with a fair educational level can be offered this program: we have used this non-myeloablative regimen in seven patients, and four of them could be transplanted fully as outpatients. Fundamental to the success of the outpatient approach is the availability of a 7 day-a-week clinic where medications and transfusions can be rapidly and efficiently provided for cytopenias, if required. Finally, it has to be mentioned that the long term-effects of the immunosuppression of the conditioning schedule are currently unknown.

Note added in proof

Twelve more patients have been allografted using this method; the procedures were completed on an outpatient basis in eight and the 13-month survival is 68%.

References

- 1 Negrin R, Storb R, Forman S. Bone marrow transplantation in malignant disease. In: McArthur JR, Schechter GP, Schrier SL (eds). *Hematology 1998*. The American Society of Hematology Education Program Book: Washington, 1998, pp 342-370.
- 2 Giral S, Estey E, Albitar M *et al*. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 1997; **89**: 4331-4336.
- 3 Slavin S, Nagler A, Naparstek E *et al*. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematological diseases. *Blood* 1998; **91**: 756-763.
- 4 Khouri IF, Keating M, Korbling M *et al*. Transplant-lite: induction of graft-versus-malignancy using fludarabine-based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor-cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol* 1998; **16**: 2817-2824.
- 5 Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Argüelles A, Pérez-Romano B *et al*. Filgrastim-mobilized peripheral-blood stem cells can be stored at 4 degrees and used in autografts to rescue high-dose chemotherapy. *Am J Hematol* 1995; **48**: 100-103.
- 6 Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Argüelles A, Piñero LA. Dos casos de trasplante heterólogo con sangre periférica. *Rev Invest Clin Méx* 1997; **49**: 41-45.
- 7 Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Argüelles A, Pérez-Romano B *et al*. Non-cryopreserved peripheral blood stem cells autotransplants for hematological malignancies can be performed entirely on an outpatient basis. *Am J Hematol* 1998; **58**: 161-164.
- 8 Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD *et al*. Autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation restores hemopoietic function following marrow ablative therapy. *Blood* 1998; **71**: 723-727.
- 9 Ruiz-Argüelles A. Flow cytometry in the clinical laboratory. Principles, applications and problems. *Ann Biol Clin* 1992; **50**: 735-743.
- 10 Ruiz-Argüelles A, Orfao A. Caracterización y evaluación de células totipotenciales en sangre periférica y médula ósea. In: Ruiz-Argüelles GJ, San-Miguel JF (eds). *Actualización en Leucemias*. Editorial Médica Panamericana: México City, 1996, pp 79-82.
- 11 Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **83**: 2934-2938.
- 12 Armitage JO. Bone marrow transplantation. *New Engl J Med* 1994; **330**: 827-838.
- 13 Thomas ED. Hematopoietic stem cell transplantation. *Sci Am* 1995; **272**: 38-47.
- 14 Ruiz-Argüelles GJ, Bruno GV. Trasplante de células totipotenciales hematopoyéticas. In: Castellanos-Coutiño J (ed). *Temas de Medicina Interna: Trasplante de órganos*. Asociación de Medicina Interna de México. McGraw Hill/Interamericana: México City, 1998, pp 85-99.
- 15 Vesole DH, Tricot G, Jagannath S, *et al*. Autotransplants in multiple myeloma: what have we learned? *Blood* 1996; **88**: 838-847.
- 16 Ruiz-Argüelles GJ, Apreza-Molina MG, Alemán-Hoey DD *et al*. Outpatient supportive therapy after induction to remission therapy in adult acute myelogenous leukaemia (AML) is feasible: a multicentre study. *Eur J Haematol* 1995; **54**: 18-20.
- 17 Ruiz-Argüelles GJ, Lobato-Mendizábal E, Delgado-Lamas JL, Gómez-Almaguer D. All *trans*-retinoic acid decreases early mortality in patients with promyelocytic leukemia and can be given entirely on an outpatient basis. *Am J Hematol* 1999; **62**: 139-143.

PUBLICACIÓN 2 - TRADUCCIÓN

Los aloinjertos de células madre hematopoyéticas utilizando un régimen de acondicionamiento no mieloablativo pueden realizarse con seguridad de forma ambulatoria: reporte de cuatro casos.

D Gómez-Almaguer, GJ Ruíz-Argüelles, A Ruíz-Argüelles, O González-Llano, OG Cantú y NE Hernández.

Bone Marrow Transplantation 2000;25:131–133.

Resumen

Hemos realizado trasplantes alogénicos de células hematopoyéticas, utilizando un régimen de acondicionamiento no mieloablativo, inmunosupresor y basado en fludarabina, de manera totalmente ambulatoria en cuatro pacientes (dos con leucemia mieloide crónica, uno con leucemia mieloide aguda y otro con talasemia mayor). El tiempo medio de recuperación de granulocitos a $0.5 \times 10^9/L$ fue de 10 días y el recuento absoluto de neutrófilos más bajo fue de $0.064 \times 10^9/L$; solo uno de los pacientes desarrolló trombocitopenia menor de $20 \times 10^9/L$. Ningún paciente requirió transfusiones de concentrado eritrocitario y sólo a uno de ellos se le administraron plaquetas una sola vez de manera profiláctica. Todos los pacientes estaban vivos entre los 210 y 390 días (mediana de 285 días), y existe evidencia definitiva de quimerismo; un paciente presentó enfermedad de injerto contra huésped, demostrada por biopsia en el día +50 que se limitó a un eritema cutáneo localizado. El procedimiento es menos costoso que el régimen mieloablativo y puede representar otra opción de tratamiento para los pacientes que requieran un trasplante alogénico de células madre.

Introducción

Para establecer aloinjertos de células madre hematopoyéticas se deben sobrepasar con éxito dos barreras, una es la enfermedad de huésped contra injerto (EHCI/rechazo) y la otra, lo opuesto, la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) [1]. Las nuevas estrategias en los alotrasplantes están basadas en el concepto de que las actuales terapias de acondicionamiento citorreductoras intensivas y tóxicas pueden ser remplazadas por inmunosupresión no mielotóxica, y que los aloinjertos de CH creen su propio espacio medular a través de las reacciones de la EICH que, además, son responsables del control de

ciertas malignidades hematológicas. En consecuencia, la inmunosupresión está dirigida contra las células del huésped antes del trasplante, y contra las células del huésped y del donante después del trasplante; el siguiente efecto es el establecimiento de una tolerancia mutua injerto-huésped que se manifiesta asimismo como un quimerismo mixto estable donante-huésped [2-4].

Materiales y Métodos

Pacientes y donantes. La Tabla 1 demuestra algunas características de los pacientes; aquellos con malignidades hematológicas habían recibido quimioterapia previamente y tenían un Karnofsky de 100% cuando se llevó a cabo el procedimiento. En todos los casos, el donante fue un hermano HLA idéntico.

Movilización y aféresis de las células madre hematopoyéticas. Al donante se le administró una dosis de 10 mg/Kg/día de factor estimulante de colonias granulocíticas (FEC-G) en los días -5 a +2. El procedimiento de aféresis se llevó a cabo los días 0, +1 y +2.

Acondicionamiento y Prendimiento. Se utilizó un régimen de acondicionamiento modificado del de Giralt *et al.* y del de Slavin *et al.*: se administraron 4 mg/Kg de busulfan oral a en los días -6 y -5; 350 mg/m² de ciclofosfamida intravenosa en los días -4, -3 y -2; 30 mg/m² de fludarabina intravenosa en los días -4, -3 y -2; 2.5 mg/Kg/día de ciclosporina A(CsA) intravenosa a en los días -1, +1, +2 y +3; y 5 mg/m² de metotrexato intravenoso en los días +1, +3, +5 y +11. Se inició la administración de 5 mg/Kg de CsA por vía oral en el día +4 y se continuó hasta el día 100 con ajustes de acuerdo a los niveles séricos, después se fue disminuyendo la dosis en un período de 30-60 días. Los productos de la aféresis con las células madre de sangre periférica fueron re-infundidos en el paciente de manera ambulatoria en los días 0, 1 y 2.

Estudios de los productos de aféresis. La cuantificación de las células blancas totales, de las células mononucleares y de las células CD34 positivas fue realizada por citometría de flujo [9].

Estudios de quimerismo. En los casos 2 y 3 se encontró una disparidad de sexo y, en consecuencia, el quimerismo se realizó por medio de la técnica de hibridación *in situ* para demostrar la presencia de los cromosomas X e Y [11] en los días 50 y 60 después de la infusión de los productos de aféresis: el 100% de las células blancas correspondieron al donante. En los casos 1 y 2 se observó una disparidad en el sistema ABO y, con el fin de evaluar el quimerismo, se llevó a cabo un estudio de citometría de flujo, en el día 60 el 30% y 49% respectivamente de las células rojas eran del donante. En el caso 4 el antígeno Cw2 del HLA estuvo presente en el donante y ausente en el receptor, encontrándose en el 80% de las células blancas en el día 60.

Resultados

Se transfundió un promedio de 11.6×10^8 células mononucleares/Kg (rango 6.2-17) y 6.1×10^6 células CD34/Kg (rango 5-7.1); las células T no fueron cuantificadas. La recuperación de los granulocitos a cifras $>0.5 \times 10^9/L$ ocurrió en los días 9, 10, 8 y 12 respectivamente. Ningún paciente requirió transfusión de glóbulos rojos y uno de ellos (el paciente 3) recibió una sola transfusión profiláctica de plaquetas. Todos los pacientes están vivos a una media de 285 días y tienen evidencia definitiva de quimerismo.

Discusión

Hemos sido capaces de realizar aloinjertos alogénicos de CH de manera ambulatoria utilizando un régimen de acondicionamiento no mieloablativo basado en dos regímenes terapéuticos que han probado su eficacia previamente [2, 3].

El principal objetivo de los estudios sobre trasplantes alogénicos de CH usando un régimen de acondicionamiento no mieloablativo es inducir un efecto de injerto contra leucemia (EICL) y, en consecuencia, los pacientes muestran EICH [1-4]. El coste medio aproximado de los cuatro procedimientos que fueron totalmente ambulatorios fue de 18.000 \$ americanos, una cifra inferior a la de los trasplantes alogénicos usando los regímenes mieloablativos convencionales, tanto en nuestra experiencia previa en México: 20.000 \$ americanos [6], como en la de otros lugares de Estados Unidos: 300.000 \$ americanos [13].

Hemos demostrado que los trasplantes alogénicos de CH pueden realizarse con seguridad de manera ambulatoria. Para el éxito de este enfoque ambulatorio es fundamental la disponibilidad de una clínica que funcione los siete días de la semana, donde los medicamentos y las transfusiones para el manejo de las citopenias puedan administrarse rápida y eficientemente. Finalmente, debe ser mencionado que los efectos a largo plazo de la inmunosupresión de los esquemas de acondicionamiento son actualmente desconocidos.

Reduced-Intensity Stem Cell Transplantation in Children and Adolescents: The Mexican Experience

David Gómez-Almaguer,¹ Guillermo J. Ruiz-Argüelles,^{2,3} Luz del Carmen Tarín-Arzaga,¹
Oscar González-Llano,¹ José Carlos Jaime-Pérez,¹ Briceida López-Martínez,^{2,3} Olga G. Cantú-Rodríguez,¹
José Luis Herrera-Garza¹

¹Hospital Universitario, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México; ²Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla, Puebla, México; ³Laboratorios Clínicos de Puebla, Puebla, México

Correspondence and reprint requests: Guillermo J. Ruiz-Argüelles, MD, FACP, FRCP (Glasg), Director General, Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla, 8B Sur 3710, 72530 Puebla, PUE, MEXICO (e-mail: gruz1@puebla.megared.net.mx).

Received June 26, 2002; accepted November 18, 2002

ABSTRACT

A group of 21 consecutive patients aged 4-20 (median 13) years was prospectively allografted using a reduced intensity preparative regimen. The group included both malignant (acute lymphoblastic leukemia, acute myelogenous leukemia, and chronic myelogenous leukemia) and nonmalignant (aplastic anemia, Diamond-Blackfan anemia, thalassemia major and adrenoleukodystrophy) conditions. Follow-up times ranged between 16 and 1038 days. Four of 21 patients (9.5%) developed acute graft-versus-host disease, and 2 of them died, whereas limited chronic graft-versus-host disease was observed in 2 of 15 cases. The 100-day mortality was 19%. Median overall survival was above 1038 days, whereas the 34-month survival was 55%. These data show that reduced intensity stem cell transplantation in children permits rapid engraftment from siblings with little toxicity.

© 2003 American Society for Blood and Marrow Transplantation

KEY WORDS

Children • Allograft • Nonmyeloablative • Transplant

INTRODUCTION

Allogeneic stem cell transplantation is a well-established treatment for several nonmalignant and malignant diseases in children. The results of this procedure have improved in recent years, but such improvement is better explained by the availability of highly effective supportive care measures rather than higher therapeutic effectiveness against the underlying disease. Despite progress in supportive therapy, myeloablative regimen toxicity still leads to a high incidence of acute and chronic side effects and contributes, in combination with the development of graft-versus-host disease (GVHD), to considerable transplant-related morbidity and mortality [1-3].

The results of stem cell transplantation in children may [2] or may not [4] be better than those in adults. The differences may be due mainly to the lower incidence and severity of organ toxicity and GVHD in younger patients [2]. On the other hand, children are more vulnerable to late sequelae, and the conditioning regimen itself accounts for many late effects [2,5]. Therefore the use of less toxic and more effective transplantation procedures in children should continue to be explored.

Recently, we and others have reported data on reduced intensity allogeneic stem cell transplantation (RIST) for hematologic disorders, using highly immunosuppressive, nonmyeloablative regimens [6-12]. The majority of these RIST procedures have been performed in adults, and occasionally in small groups of children. We report here our experience in 21 children and adolescents who received allografts with peripheral blood using a low-intensity conditioning regimen.

MATERIAL AND METHODS

Patients and Donors

All consecutive patients aged 4-20 years were included. Table 1 shows some of the patients' characteristics. Those with hematological malignancies had received prior chemotherapy and had a Karnofsky score of 80%-100% and those with non-malignant diseases had a Karnofsky score of 100% when the procedure was performed. The donor was an HLA-identical sibling in all instances. Institutional review board approval and

Table 1. Salient Features of the Allografted Patients

Patient No.	Age (y)	Sex	Diagnosis	OP*	Status	Postallograft Days	Chimerism
1	14	M	AML-M2	yes	D-Rel	323	HLA
2	14	F	Thal	yes	A-Rem	1038	ABO
3	10	M	ALL 2 rem	yes	D-Rel	112	MS
4	4	M	ALL 2 rem	yes	D-Rel	546	HLA
5	17	M	ALL 2 rel		D-aGVHD	121	ABO
6	12	F	ALL 2 rem	yes	D-Rel	90	
7	17	M	ALL 2 rel		A-Rem†	695	ABO, MS
8	19	M	ALL 3 rem		A-Rem†	647	ABO
9	20	M	ALL 2 rem	yes	A-Rem	647	
10	9	M	ALL 2 rem	yes	D-Rel	277	xx/xy, MS
11	20	M	CML		A-Rem, cGVHD	491	
12	19	F	ALL 2 rem		D-aGVHD	85	
13	12	M	ALL 1 rel		D-sepsis	16	
14	20	M	ALL		A	149	ABO
15	13	F	ALL 2 rel	yes	A	130	xx/xy, MS
16	5	F	DBA	yes	A-cGVHD	121	xx/xy/Rh/MS/ABO
17	4	M	DBA	yes	A	88	
18	12	F	AA		A	133	ABO
19	9	M	ALD	yes	D-sepsis	50	
20	4	M	AA		A-cGVHD	106	xx/xy
21	9	M	ALL ref		A	89	xx/xy

aGVHD indicates acute graft-versus-host disease; cGVHD, chronic graft-versus-host disease; Thal, thalassemia major; AML, acute myelogenous leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; CML, chronic myelogenous leukemia; DBA, Diamond-Blackfan anemia; AA, aplastic anemia; ALD, adrenoleukodystrophy; A, alive; D, dead; Rel, relapse; Rem, remission; Ref, refractory; HLA, HLA chimerism; ABO, blood group chimerism; MS, microsatellites chimerism; xx/xy, sex chimerism; Rh, Rh chimerism.

*Outpatient completion of the allograft.

†Patients with aGVHD.

written consent from all the patients and/or their parents was obtained.

Hematopoietic Stem Cell Mobilization and Peripheral Blood Stem Cell Apheresis

Granulocyte colony-stimulating factor (10 µg/kg per day) was administered to the donors on days -4 to +1. The apheresis procedures were performed on days 0 and +1; a third procedure was done when necessary. A Haemonetics V-50 PLUS machine (Haemonetics Corporation, Braintree, MA) or a Baxter C-3000 PLUS machine (Baxter Health Care, Deerfield, IL) was employed, following the Spin-Nebraska protocol. The endpoint of collection was the processing of least 6000-7000 mL of blood per square meter in each of 3 apheresis procedures [5,6,11], to obtain at least $1-6 \times 10^8$ mononuclear cells per kilogram of the recipient.

Conditioning and Grafting

A modification of the RIST conditioning regimens described by Giralt et al. [10] and Slavin et al. [1] was used. In 18 children, 4 mg/kg of oral busulphan was delivered on days -6 and -5; 350 mg/m² of intravenous cyclophosphamide and 30 mg/m² was delivered on days -4, -3, and -2; 5 mg/kg of oral cyclosporin A (CyA) was started on day -1; and 5 mg/m² of intravenous methotrexate was delivered on days +1, +3, +5, and +11. In 2 children with aplastic anemia and 1 with Diamond-Blackfan anemia, instead of busulphan and cyclophosphamide, 70 mg/m² of intravenous melphalan was given on days -7 and -6, and 30 mg/m² of intravenous fludarabine was given

on days -6 to -1. Oral CyA was continued through day 100, with adjustments according to serum CyA; it was then tapered over 30-60 days. Ondansetron was used in order to avoid nausea and vomiting, ciprofloxacin (250 mg twice daily) and itraconazole or fluconazole (100 mg twice daily) were used in all patients; antibiotics and antimycotics were used until more than 0.5×10^9 /L granulocytes were present. When either patients or donors had anticytomegalovirus antibodies, patients were given oral ganciclovir (250 mg three times daily) for 100 days. The products of the peripheral blood stem cell apheresis were infused on days 0 and +1, and sometimes +2.

Apheresis Product Studies

Enumeration of the total white blood, mononuclear, and CD34⁺ cells was done by flow cytometry [13] in an EPICS Elite ESP apparatus (Coulter Electronics, Hialeah, FL), using the anti-CD34 monoclonal antibody [14] HPCA-2 (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Chimerism Studies

In cases with a sex mismatch, a fluorescent in situ hybridization technique to demonstrate the X and Y chromosomes was done [15]; in cases with ABO system mismatch a flow cytometry-based approach was used, whereas restriction fragment length polymorphism studies were used in cases without such mismatches [16]. Studies were done on days 30 and 60 after the infusion of the apheresis products.

RESULTS

Twenty-one patients were allografted: 13 with acute lymphoblastic leukemia (ALL) (7 in second remission, 1 in third remission, 1 in first relapse, 3 in second relapse, and 1 primarily refractory to therapy), 1 with acute myelogenous leukemia, 1 with chronic myelogenous leukemia in accelerated phase, 2 with aplastic anemia, 2 with Diamond-Blackfan anemia, 1 with thalassemia major, and 1 with adrenoleukodystrophy. The median age of the patients was 13 years (range 4-20). There were 6 female patients and 15 male patients. The median granulocyte recovery time to $0.5 \times 10^9/L$ was 13 days (range 11-34), whereas the median platelet recovery time to $20 \times 10^9/L$ was 13 days (range 11-22). The median number of packed red blood cell units transfused was 1 (range 0-7) and the median number of platelet transfusion sessions was 1 (range 0-27). In 11 children the procedure was completed fully on an outpatient basis.

Follow-up times range between 16 and 1038 days; 15 individuals have been followed up for more than 100 days. Four of 21 patients (9.5%) developed acute GVHD disease and 2 of them died, whereas limited chronic GVHD was observed in 2 of the 15 followed-up cases. The remaining patients did not develop febrile neutropenia, veno-occlusive disease, mucositis, severe nausea, or diarrhea. Nine patients have died, 5 of them as a result of relapse of the malignancy. In 4 cases toxicity from the procedure was the cause of death—2 were due to acute GVHD and 2 to overwhelming infections. The 100-day mortality was 19%. In the whole group, median overall survival is above 1038 days, whereas the 34-month survival is 55%. Two-year survival of patients with nonmalignant diseases was significantly higher than that of children with malignant diseases (83% vs 44%, $P < .01$). Details of the chimerism kinetics of some of the patients have been published previously [15]; chimerism with more than 90% in donor cells on day 60 and afterward has been shown in 13 patients (Table 1). One patient died from sepsis without any evidence of chimerism (case 13).

The most numerous subgroup consisted of 13 patients with ALL, 8 in second or third remission, 4 in relapse, and 1 primarily refractory to therapy. Seven of them (53%) died, with a mean survival time of 178 days. Two of the 4 relapsed cases are alive and in complete remission at 135 and 700 days after the RIST, respectively; the patient with refractory ALL remained alive, 94 days after the graft. The patients with heavily pretransfused aplastic anemias are alive 106 and 133 days after the allograft, one of them with a limited form of GVHD, transfusion-free and with normal peripheral blood counts. One of the two patients (number 17) with Diamond-Blackfan anemia failed to engraft but is alive 88 days after the transplant, and the other is alive, chimerised at 121 days after the graft. The patient with homozygous beta thalassemia is alive 1038 days after the graft, transfusion-free and fully chimerised; she got married after her condition turned into heterozygous beta thalassemia, as her HLA-identical sibling donor was heterozygous for the disease.

DISCUSSION

In recent years we have been interested in changes to the therapeutic approaches for hematologic diseases that may result

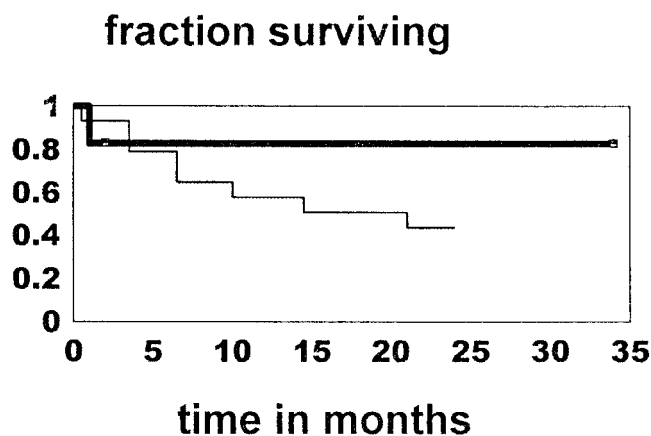


Figure 1. Overall survival of 21 children given reduced-intensity allogeneic stem cell allografts. The thick line refers to children with non-malignant conditions, whereas the thin line depicts the survival of children with malignant diseases.

in both simplification and reduction of costs, especially in stem cell transplants. In a pilot study we have shown that allogeneic stem cell transplantation can be performed safely on an outpatient basis, if low-intensity regimens are used [8,9]. This initial encouraging experience has been extended to a larger group of patients, including children and adolescents. With the available protocols for children with malignant and nonmalignant blood diseases, intensive pretransplantation conditioning appears to be a prerequisite for reliable engraftment; however, this was not the case in this group of children. RIST using our regimen was well tolerated, the duration of cytopenias was brief, and the incidence of other complications was low. We have shown previously that peripheral blood stem cell allografting can be conducted fully on an outpatient basis if reduced-intensity preparative regimens are chosen [17,19]; in this group of children, we were able to conduct the allograft fully on an outpatient basis on 11 of 21 cases. It is our policy to conduct all RIST on an outpatient basis; however, in cases in which socioeconomic problems do not allow this approach, we admit the patients to the hospital [17,19]. This approach, together with the other changes that we have made in the preparative regimens results in diminished costs of the allografting procedure—we were able to calculate that the median cost of the allografts using this approach is USD 18 000 [17,19].

RIST may also control neoplastic diseases in advanced stages, but, despite encouraging results, recurrence of the disease remains the most important cause for transplant failure [1-2,10,11]. In our group of patients, 8 of 15 individuals with advanced malignancy who were followed-up died, mostly children with ALL; and, as expected, 5 died as a result of relapse. In contrast, only 1 patient in the group of 6 cases with nonmalignant diseases died. As a result, the 2-year survival of patients with nonmalignant diseases was significantly higher than that for children with malignant diseases (83% vs 44%, $P < .01$) (Figure 1).

Limited nonhematologic and hematologic toxicity and faster hematopoietic recovery compared with those produced by standard protocols were observed in almost all cases. It is interesting that we have not seen a single case of cytomegalovirus-

related death or disease [20]. Because children who receive transplants are surviving longer, late effects are becoming more apparent: thyroid abnormalities, gonadal failure, and growth hormone deficiency are some of the more frequent late effects observed in childhood after the transplant process, particularly in children receiving total body irradiation-containing regimens. Additional complications are well documented, including neurologic, pulmonary, dental, cardiac, ophthalmologic, and skeletal sequelae [2-5,7]. Furthermore, the risk of secondary malignant diseases, especially for patients prepared with total body irradiation-containing regimens, is particularly relevant because the immune system may be impaired for many years after transplantation. It remains to be shown if these late effects of allografting are lesser when using RIST.

The incidence of acute GVHD and its severity appears to be similar between RIST and standard allografting procedures. However, it is notable that its onset is comparatively delayed after RIST and often occurs after full recovery from conditioning toxicity; this definitely contributes to mitigating the severity of GVHD-related tissue damage. In many patients with nonmalignant diseases, this potentially curative approach of allogeneic transplant is not undertaken because of unacceptable high transplant-related mortality; however, RIST represents a promising therapeutic alternative. The present report includes 6 patients with nonmalignant diseases; all but 1 remained alive, and 1 had a limited chronic GVHD. Concerning the control of the underlying disease in the patients with leukemia, these results should be reviewed carefully against the background of the advanced stage of the disease and the relatively short follow-up period of the patients described here.

RIST is much better tolerated and leads to lower toxicity than conventional chemotherapy or allografting, thus offering patients the prospect of improvement in both quality of life and cost-effectiveness. This strategy may be considered safe enough to be carried out in some circumstances in an outpatient setting, with evident reduction of transplant-related costs [17,19]. This is critical in developing countries where very few individuals can have access to sophisticated treatments such as conventional bone marrow transplantation, and this is the main reason for our adapting the conditioning regimens and choosing the more accessible drugs and methods to conduct RIST [17,19].

In summary, we have demonstrated that RIST in children permits rapid engraftment from siblings with little toxicity, even in the presence of advanced disease. This may represent the treatment of choice for patients who are ineligible for conventional stem cell allografts and may even replace conventional allografting. Long-term follow-up is needed before this approach can be extended to patients with more favorable conditions. As other authors have asked, we wonder whether "it is time to reduce toxicity by reduced intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation in children" [21].

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are most grateful to Dr. Ronald D. Barr, from McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada, for his careful and most helpful review and criticism of the manuscript.

REFERENCES

1. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, et al. Non-myeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and non-malignant hematological diseases. *Blood*. 1998;91:756-763.
2. Pession A, Rondelli R, Paolucci P, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in childhood: report from the bone marrow transplantation group of the Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica. *Haematologica*. 2000;85:638-645.
3. Bearman SI, Appelbaum FR, Buckner CD, et al. Regimen-related toxicity in patients undergoing bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*. 1988;6:1562-1568.
4. McGlave PB, Haake RJ, Bostron BC, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for acute non-lymphocytic leukemia in first remission. *Blood*. 1988;72:1512-1517.
5. Sanders JE. Growth and development after hematopoietic cell transplantation. In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, eds. *Hematopoietic Cell Transplantation*. Malden, UK: Blackwell Science; 1999:764-775.
6. Barret J, Richards C. Non-myeloablative stem cell transplants. *Br J Haematol*. 2000;111:6-17.
7. Miniario R, Zecchina G, Nagler A. Non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation in children. *Haematologica*. 2000;85(suppl 11):12-17.
8. Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles A, González-Llano O, Cantú O, Jaime-Pérez JC. Results of an outpatient-based stem cell allotransplant program using nonmyeloablative conditioning regimens. *Am J Hematol*. 2001;66:241-244.
9. Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Argüelles A, González-Llano O, Cantú OG, Hernández NE. Hematopoietic stem cell allografts using a non-myeloablative conditioning regimen can be safely performed on an outpatient basis. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25:131-133.
10. Giralt S, Estey E, Albitar M, et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood*. 1997;89:4531-4536.
11. Khouri IF, Keating M, Korbling M, et al. Transplant-lite: induction of graft-versus-host malignancy using fludarabine-based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor-cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol*. 1998; 16:2817-2824.
12. Childs R, Contentin N, Clave E, et al. Reduced toxicity and transplant related mortality following non-myeloablative peripheral blood stem cell transplantation for malignant disease. *Blood*. 1999; 94(suppl 1):393a.
13. Ruiz-Argüelles A. Flow cytometry in the clinical laboratory. Principles, applications and problems. *Ann Biol Clin*. 1992;50:735-743.
14. Ruiz-Argüelles A, Orfao A. Caracterización y evaluación de células totipotenciales en sangre periférica y médula ósea. In: Ruiz-Argüelles GJ, San-Miguel JF, eds. *Actualización en leucemias*. México City: Editorial Médica Panamericana; 1996:79-82.
15. Ruiz-Argüelles GJ, López-Martínez B, Santellán-Olea MR, et al. Follow up of hemopoietic chimerism in individuals given allogeneic hemopoietic stem cell allografts using an immunosuppressive, non-myeloablative conditioning regimen: A prospective study in a single institution. *Leukemia Lymph*. 2002;43:1509-1511.

16. Yam P, Petz L, Knowlton R, et al. Use of DNA restriction fragment length polymorphisms to document marrow engraftment and mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation. *Transplantation*. 1987;43:399-407.
17. Ruiz-Argüelles GJ. "The Mexican approach" to conducting non-myeloablative stem cell transplantation [letter]. *Eur J Haematol*. 2001;67:335.
18. Ruiz-Argüelles GJ. Allogeneic stem cell transplantation using non-myeloablative conditioning regimens: results of the Mexican approach. *Int J Hematol*. 2002;76(suppl 1):376-379.
19. Ruiz-Argüelles GJ. Outpatient programs of myeloablative chemotherapy, autologous and allogeneic bone marrow transplantation. *Haematologica*. 2000;85:1233-1234.
20. Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Almaguer D, López-Martínez B, Ponce-de-León S, Cantú-Rodríguez OG, Jaime-Pérez JC. No cytomegalovirus-related deaths after non-ablative stem cell allografts. *Hematology*. 2002;7:95-99.
21. Svenilsson J, Ringden O. Is it time to reduce toxicity by non-myeloablative conditioning for allogeneic stem cell transplantation in children? *Pediatr Transplant*. 2000;4:300-304.

PUBLICACIÓN 3 - TRADUCCIÓN

Trasplante de células hematopoyéticas en niños y adolescentes sometidos a un régimen de intensidad reducida: la experiencia mexicana.

David Gómez-Almaguer, Guillermo J Ruiz-Arguelles, Luz del Carmen Tarín-Arzaga, Oscar González-Llano, José Carlos Jaime-Pérez, Briseida López- Martínez, Olga G. Cantú-Rodríguez, José Luis Herrera-Garza.

Biology of Blood and Marrow Transplantation 2003;9:157-161.

Resumen

Un grupo de 21 pacientes con edades entre 4-20 años (mediana de 13 años) fueron aloinjertados prospectivamente utilizando un régimen de intensidad reducida. El grupo incluía enfermedades malignas (leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda y leucemia mieloide crónica) y no malignas (anemia aplásica, anemia de Diamond-Blackfan, talasemia mayor y adrenoleucodistrofia). El seguimiento tuvo un rango entre 16 y 1038 días. Cuatro de los 21 pacientes (9.5%) desarrollaron enfermedad injerto contra huésped aguda, 2 de ellos murieron; además, se observó enfermedad injerto contra huésped crónica en 2 de los 15 casos. En el día 100, la mortalidad fue del 19%. La mediana de la tasa de supervivencia fue mayor a 1038 días, mientras que la supervivencia a 34 meses fue del 55%. Estos datos demuestran que el trasplante de células hematopoyéticas con un régimen de intensidad reducida en niños y adolescentes permite un prendimiento más rápido con menor toxicidad.

Introducción

El trasplante de células hematopoyéticas alogénico es un tratamiento bien definido en niños para diversas enfermedades malignas y no malignas. A pesar de los progresos en estas terapias, la toxicidad del régimen mieloablativo sigue siendo la principal causa de incidencias de efectos tanto agudos como crónicos, y contribuye, en combinación con la enfermedad injerto contra huésped (EICH), a la morbilidad y mortalidad que conlleva el trasplante [1-3]. Los resultados que se han visto en los trasplantes de células hematopoyéticas en niños [2] pueden ser, o no [4], mejores que en los adultos. La diferencia probablemente se explica por la baja incidencia y severidad de la toxicidad orgánica y de la enfermedad injerto contra huésped en los pacientes jóvenes [2]. Por otra parte, los niños son más vulnerables a las secuelas tardías y el régimen de acondicionamiento por sí mismo contribuye a muchos

efectos tardíos [2,5]. Por lo que la utilización de procedimientos menos tóxicos y más efectivos en los trasplantes se debe seguir explorando. Recientemente hemos publicado, al igual que otros autores, la realización de trasplantes alogénicos de células hematopoyéticas de intensidad reducida (TCHIR) para enfermedades hematológicas utilizando inmunosupresores potentes en regímenes no mieloablativos [6-12]. La mayoría de estos TCHIR se han llevado a cabo en adultos y en pequeños grupos de pacientes pediátricos. En este artículo referimos nuestra experiencia sobre 21 niños y adolescentes que recibieron trasplante con sangre periférica usando un régimen de acondicionamiento de intensidad reducida.

Material y Métodos

Pacientes y donantes. Se incluyeron todos los pacientes menores de 20 años. La tabla 1 muestra algunas de las características de los pacientes. Aquellos con enfermedades hematológicas recibieron quimioterapia previa y obtuvieron una puntuación de Karnofsky de 80-100%; los que no tuvieron una enfermedad maligna obtuvieron una puntuación en la escala de Karnofsky del 100% en el día de inicio del procedimiento. En todos los casos, los donantes fueron hermanos HLA idénticos.

Movilización de las células hematopoyéticas y realización de la aféresis de sangre periférica. Entre los días -4 y +1 se administró a los donantes factor estimulante de colonias de granulocitos (10 μ g/Kg/día). La aféresis se realizó en los días 0 y +1.

Acondicionamiento y prendimiento. Se utilizó una modificación del régimen de acondicionamiento de TCHIR descrita por Giralt *et al.* [10] y Slavin *et al.* [1]. En 18 niños, se administraron 4mg/Kg de busulfan oral los días -6 y -5, 350mg/m² de ciclofosfamida intravenosa en los días -4, -3 y -2, y 5mg/Kg de ciclosporina A por vía oral desde el día -1, y 5mg/m² de metotrexato intravenoso en los días +1, +3, +5 y +11. En dos de los niños con anemia aplásica y en un paciente con anemia de Diamond-Blackfan, se cambió el busulfan y la ciclofosfamida por melfalan en los días -7 y -6 a 70mg/m²/día y fludarabina intravenosa del día -6 al -1 a 30mg/m². La ciclosporina A oral se continuó hasta el día 100, ajustando la dosis de acuerdo a sus niveles séricos; después se disminuyó en 30-60 días.

Estudio de los productos de la aféresis. El recuento de leucocitos totales, células mononucleares y células CD34+ se realizó mediante citometría de flujo [13].

Estudios de quimerismo. En los casos en los que no había una concordancia en el sexo se realizó la técnica de hibridación *in situ* fluorescente para demostrar la presencia de los cromosomas X e Y [15]; en los casos con discordancia en el sistema ABO se utilizó citometría de flujo, mientras que en los casos sin incompatibilidad se utilizaron estudios de fragmentos de restricción de longitud polimórfica [16]. Los estudios se realizaron en los días 30 y 60 después de la infusión de los productos de la aféresis.

Resultados

Veintiún pacientes fueron trasplantados: 13 de los cuales tenían leucemia linfoblástica aguda (LLA) (7 en segunda remisión, 1 en tercera remisión, 1 en primera recaída, 3 en segunda recaída y 1 refractario desde el diagnóstico), 1 con leucemia mieloide aguda, 1 con leucemia mieloide crónica en fase acelerada, 2 con anemia aplásica, 2 con anemia de Diamond-Blackfan, 1 con talasemia mayor y 1 más con adrenoleucodistrofia. La mediana de edad de los pacientes fue de 13 años (rango de 4 a 20). Se tuvieron 6 pacientes femeninas y 15 pacientes masculinos. La mediana del tiempo de recuperación de granulocitos ($0.5 \times 10^9/L$) fue de 13 días (rango de 11 a 34), igual que el tiempo de recuperación plaquetaria ($20 \times 10^9/L$) (13 días, rango de 11 a 22). La mediana de transfusiones fue de 1 (rango de 0 a 7) y una mediana de trasfusión plaquetaria de 1 (rango 0 a 27). En 11 niños el procedimiento fue completamente de manera ambulatoria.

El seguimiento fue entre 16 y 1038 días, a 15 de los individuos se les siguió durante más de 100 días. Cuatro de los 21 pacientes (9.5%) desarrollaron enfermedad injerto contra huésped aguda, de los cuales 2 murieron; en 2 de los 15 pacientes se observó enfermedad crónica de injerto contra huésped. El resto de los pacientes no desarrollaron neutropenia, enfermedad veno oclusiva, mucositis, náuseas graves o diarrea. Nueve de los pacientes murieron, 5 por causa de la malignidad de base, 4 de ellos murieron por la toxicidad del procedimiento, 2 tenían enfermedad injerto contra huésped aguda y 2 más presentaron infecciones. Al día 100, la mortalidad fue del 19%. En todo el grupo la tasa de supervivencia

fue de más de 1038 días, mientras que a los 34 meses la supervivencia fue del 55%. A los dos años la supervivencia de los pacientes con enfermedades no malignas fue significativamente más alta que la supervivencia en los niños con enfermedades malignas (83% contra 44%, $p < 0.01$). Los detalles de la cinética del quimerismo para algunos de los pacientes se ha publicado previamente [15]; en 13 de los pacientes se encontró quimerismo con más del 90% de las células del donante después del día 60 (tabla 1). Uno de los pacientes murió por sepsis sin ninguna evidencia de quimerismo (caso 13).

El subgrupo más numeroso consistió en 13 pacientes con LLA, 8 que estaban en segunda o tercera remisión, 4 en recaída, y uno con enfermedad refractaria primaria. Siete de estos (53%) murieron con una supervivencia de 178 días. Dos de los 4 que estaban en recaída están vivos y con remisión completa a los días 135 y 700 después del TCHIR; el paciente con LLA refractaria seguía vivo 94 días después del injerto.

Discusión

En un estudio piloto se ha demostrado que el trasplante alogénico de células hematopoyéticas puede realizarse de manera segura de forma ambulatoria si se utiliza un régimen de intensidad reducida [8, 9]. Esta experiencia inicial se extendió a un grupo más grande de pacientes que incluyó a niños y adolescentes.

El TCHIR utilizando nuestro régimen fue bien tolerado, la duración de las citopenias fue breve, y la incidencia de otras complicaciones, baja. Nosotros hemos mostrado previamente que el trasplante de células hematopoyéticas por sangre periférica se puede realizar completamente de manera ambulatoria si se elige un régimen de intensidad reducida [17,19]. En este grupo de niños, pudimos llevar el procedimiento de manera totalmente ambulatoria en 11 de los 21 pacientes.

El TCHIR puede llegar a controlar las enfermedades neoplásicas en estadios avanzados, pero, a pesar de resultados alentadores, la recurrencia de la enfermedad continúa siendo la causa más importante del fracaso del trasplante [1-2, 10, 11]. En nuestro grupo de pacientes, 8 de los 15 individuos evaluados con enfermedad maligna avanzada murieron, la mayoría niños con LLA y, como se esperaba, 5 murieron a causa de recaída de su enfermedad. En

contraste, sólo un paciente murió del grupo de seis casos con enfermedades no malignas. A los dos años de seguimiento los pacientes que no tenían enfermedad maligna tuvieron una supervivencia mayor que los niños con una enfermedad maligna (83% vs 44%, $p < 0.01$) (figura 1).

En la mayoría de los casos, se observó una recuperación hematopoyética más rápida y una toxicidad hematológica y no hematológica limitada, cuando se comparó con los protocolos estándar. Debido a que los niños que reciben un trasplante tienen supervivencias más largas los efectos tardíos son cada vez más aparentes, las anomalías tiroideas, el fallo gonadal y la deficiencia de la hormona de crecimiento son los efectos tardíos más frecuentes en los niños después del trasplante, particularmente en aquellos que recibieron radiación corporal total en el régimen de acondicionamiento. Otras complicaciones bien documentadas incluyen las secuelas neurológicas, pulmonares, dentales, cardíacas, oftalmológicas y óseas [2-5,7].

La incidencia de EICH aguda y su severidad parece ser similar entre los TCHIR y los regímenes mieloablativos; sin embargo, es notable que el inicio sea más tardío con los TCHIR y frecuentemente se produzca una vez que ha ocurrido la recuperación completa de la toxicidad debido al acondicionamiento; esto definitivamente contribuye a mitigar la severidad del daño a los tejidos relacionada a la EICH.

Este reporte incluye 6 pacientes con enfermedad no maligna; todos están vivos a excepción de uno, y uno de ellos tiene EICH crónica limitada. En cuanto al control de la leucemia, en este grupo de pacientes los resultados deben revisarse cuidadosamente teniendo en cuenta el antecedente de un estado de enfermedad avanzada y el tiempo corto de seguimiento que se describe aquí.

Esta estrategia se debe considerar lo suficientemente segura para llevarse a cabo en algunas circunstancias de manera ambulatoria, con una evidente reducción de los costes relacionados con el trasplante [17,19]. Esto es muy importante en países en vías de desarrollo donde pocas personas pueden tener acceso a tratamientos sofisticados, como lo es el trasplante de médula ósea convencional. Ésta es la razón principal de adaptar nuestro

régimen de acondicionamiento y elegir los medicamentos y métodos más accesibles para practicar el TCHIR [17,19].

En resumen, hemos demostrado que el TCHIR en niños permite un rápido prendimiento con poca toxicidad, inclusive en casos con enfermedad avanzada. Esto puede representar un tratamiento de elección para pacientes que no pueden elegir un trasplante convencional y podría llegar a reemplazar a esta variedad de trasplante. Al igual que otros autores, nos preguntamos “si es el momento de reducir la toxicidad mediante regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida en los trasplantes alogénicos de células madre en niños” [21].

Case report

Successful father-to-son stem cell transplantation in a child with hemophagocytic lymphohistiocytosis using a reduced-intensity conditioning regimen

Gonzalez-Llano O, Jaime-Pérez J, Cantu-Rodríguez O, Mancias-Guerra C, Gutierrez-Aguirre H, Herrera-Garza J, Gomez-Almaguer D. Successful father-to-son stem cell transplantation in a child with hemophagocytic lymphohistiocytosis using a reduced-intensity conditioning regimen.

Abstract: *Objective:* Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) is an uncommon disorder, usually lethal without allogeneic stem cell transplantation (SCT). *Materials and methods:* We report a 9-month-old boy, the first child of consanguineous parents, diagnosed with HLH and neurological involvement demonstrated by magnetic resonance imaging (MRI), who received an allogeneic SCT from his HLA genetically matched father. Transplant was performed after a reduced-intensity conditioning (RIC) regimen consisting of cyclophosphamide, fludarabine, and melphalan. Graft vs. host disease (GVHD) prophylaxis included cyclosporine a and methotrexate. *Results:* An absolute neutrophil count of $0.5 \times 10^9/L$ was documented on day +20 and a platelet count $> 20 \times 10^9/L$ was shown by day 33. Full donor chimerism was showed on day +175. A follow-up brain MRI was reported normal. Twenty months after SCT, the child shows no evidence of HLH or GVHD activity, and has a normal psychomotor development. *Conclusion:* Given the reduced toxicity of SCT with RIC, it could represent an attractive transplant method for children with HLH, in whom myeloablation plays no role in disease eradication, and in whom mixed chimerism may be enough to cure the disease.

Oscar Gonzalez-Llano, Jose Jaime-Pérez, Olga Cantu-Rodríguez, Consuelo Mancias-Guerra, Homero Gutierrez-Aguirre, Jose Herrera-Garza, David Gomez-Almaguer

School of Medicine and University Hospital, "Dr. Jose E. Gonzalez", Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey, Mexico

Key words: allogeneic stem cell transplantation; hemophagocytic lymphohistiocytosis; reduced-intensity conditioning regimen

Correspondence: Oscar Gonzalez-Llano, School of Medicine and University Hospital, "Dr. Jose E. Gonzalez", Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Ave. Madero y Gonzalitos s/n, Colonia Mitrás Centro, Monterrey, Nuevo Leon, C.P. 64460, Mexico
Tel:+81-8386756718
Fax:+81-8386756717
e-mail: ogzll25@hotmail.com

Accepted for publication 11 April 2006

Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) is a rare non-neoplastic disease and invariably fatal when untreated (1, 2). HLH is categorized in two different conditions which may be difficult to distinguish from each other: a primary form, or familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL), with an autosomal-recessive mode of inheritance, and secondary lymphohistiocytosis, a sporadic syndrome occurring in association with viral systemic infection, neoplastic disorders, and immunodeficiency (3). Clinical features include fever, hepatosplenomegaly, pancytopenia, hypertriglyceridemia, low fibrinogen levels, liver dysfunction and a high frequency of neurological

symptoms (e.g. seizures and coma), with hemophagocytosis in bone marrow as well as other reticuloendothelial tissues (4).

Hemophagocytic lymphohistiocytosis is rarely curable by chemotherapy alone. The protocols recommended by the Histiocyte Society, consisting of dexamethasone, etoposide, cyclosporine, and intrathecal methotrexate have improved the survival, its primary goal being to reach a clinically stable condition, to eventually try to cure it with stem cell transplantation (SCT) (2, 5–9).

In 1997, we performed a successful bone marrow transplant in a child with HLH using a less toxic, but still myeloablative, conditioning regimen (10).

We have since then developed experience using a reduced intensity conditioning (RIC) regimen SCT in children (11). As currently there is scarce information regarding RIC regimen SCT as a therapeutic modality in HLH, we report here a successful case where a regimen of this kind was employed.

Case report

A 3-month-old Hispanic male, the first child of first-degree consanguineous parents, had a 7 d history of fever. He was pale, with hepatomegaly and splenomegaly 4 and 5 cm below the costal margins, respectively. His hemoglobin was 6.0 g/L, with an absolute neutrophil count of 800/ μ L and a platelet count of 40 000/ μ L. Lactate dehydrogenase value was 720 U/L ($n = 90$ –210), triglycerides, 1130 mg/dL and serum ferritin, 770 ng/ μ L ($n = 7$ –144). The search for syphilis, rubella, toxoplasma, herpes, cytomegalovirus, Epstein Barr virus, and HIV was negative. There was no familial history of HLH or immunological disorders. Bone marrow examination revealed hypocellularity with a diffuse histiocytic infiltrate with hemophagocytosis, suggesting the diagnosis of familial HLH.

A regimen of etoposide, 150 mg/m²/d for 3 d, dexamethasone, 0.3 mg/kg/d for seven consecutive days was initiated. Cerebral spinal fluid (CSF) was normal, however a single dose of intrathecal MTX was administered. A good response was obtained, with the same cycle being repeated three times, one every 3 wk. Three months into his clinical course the patient developed seizures. A brain magnetic resonance imaging (MRI) showed white matter abnormalities, mainly in the brain stem and occipital cortex (Fig. 1); CSF contained 40 cells/mm³. Dexamethasone and phenobarbital therapy was initiated; 3 wk later, cyclosporine A (CSA), and a new cycle of the same chemotherapy scheme were administered. The patient improved steadily and 6 months after the initial diagnosis an allogeneic SCT was performed. The donor was the patient's healthy 26 yr old, HLA genetically matched father.

A reduced-intensity conditioning regimen was employed using cyclophosphamide, 350 mg/m²/d (–6, –5, –4), fludarabine, 30 mg/m²/d (–6, –5, –4) and melphalan, and 70 mg/m²/d (–3, –2). The donor was mobilized with filgrastim, 5 μ g/kg/d for 3 d. Peripheral blood stem cells were collected by apheresis on transplant day 0 using a Baxter CS3000 plus machine (Baxter Healthcare, Deerfield, IL, USA). The number of CD34+ cells infused was 9×10^6 kg⁻¹ of recipient's body weight. Graft vs. host disease (GVHD) prophylaxis included CSA (3 mg/K/d) day –1, and methotrexate, 5 mg/m² on days +1, +3, and +5.

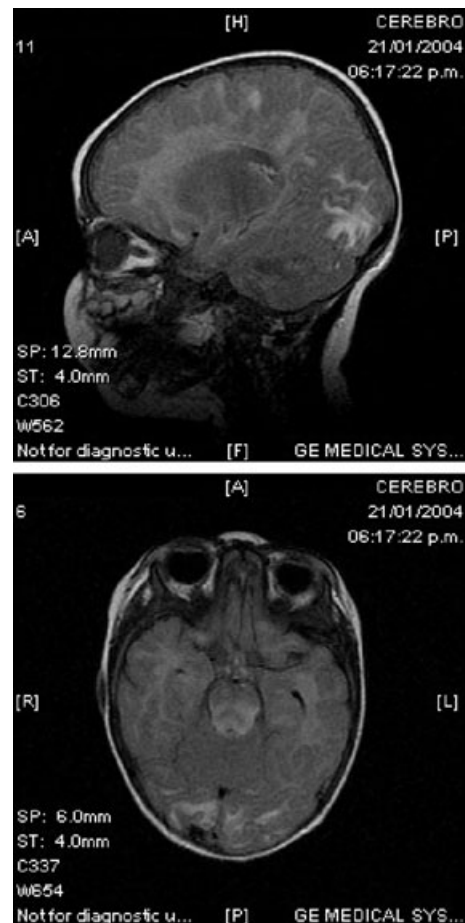


Fig. 1. Central nervous system (CNS) magnetic resonance imaging of a 9-month-old boy with Hemophagocytic lymphohistiocytosis obtained after developing generalized tonic-clonic seizures. White matter abnormalities, mainly in the occipital cortex and the brain stem, demonstrated CNS infiltration.

Infection prophylaxis was provided through the infusion of intravenous gamma globulin weekly on two occasions (+7 and +14), in addition to acyclovir, itraconazole, ciprofloxacin, and trimethoprim + sulfamethoxazole at standard doses.

The patient developed pneumonia on day 4 post-transplant, treated successfully with imipenem and teicoplanin; he was discharged on day +18, and an absolute neutrophil count of 0.5×10^9 /L documented on day +20, with a platelet count $> 20 \times 10^9$ /L was shown by day 33.

Acute GVHD grade I, restricted to intestinal involvement, was observed on day +65, requiring the addition of oral prednisolone for its complete control. Chimerism analyzes was performed on FACS-sorted cells by fluorescent *in situ* hybridization, which showed full donor chimerism on day +175. A follow-up brain MRI was reported normal on day +260 (Fig. 2).

Twenty-three months after SCT the child shows no evidence of HLH or GVHD activity, and has an

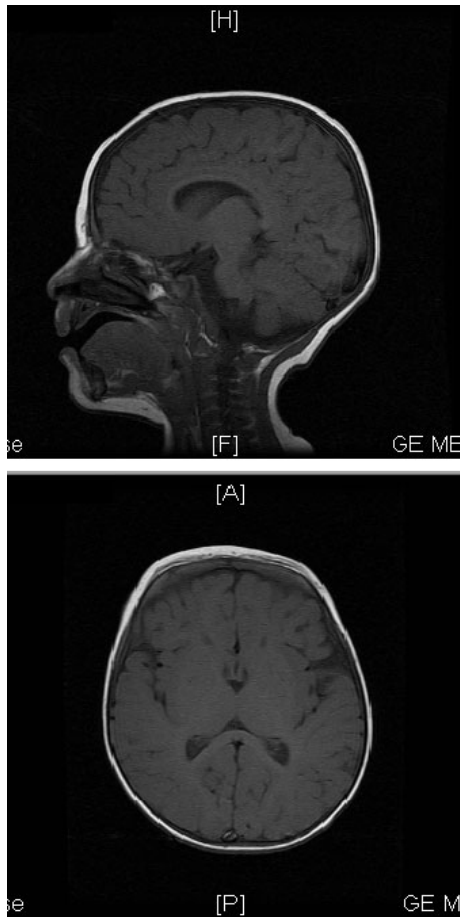


Fig. 2. Central nervous system magnetic resonance imaging obtained on the day +260 of stem cell transplantation reported without evidence of abnormalities.

excellent psychomotor development with a Lansky score of 100%.

Discussion

Hemophagocytic lymphohistiocytosis implies non-malignant generalized histiocytic proliferation with hemophagocytosis. It can be separated into two conditions, familial and secondary HLH, that are often difficult to differentiate from each other. Our patient met six of the eight diagnostic criteria established for the diagnosis of HLH (4), and was defined like being a familial form due to the close consanguineous parental relationship, and the early onset age (5, 9, 12, 13). Natural killer cell activity and soluble CD25 determination, important for establishing the diagnosis and to differentiate between both forms (14), were not measured.

Currently, it is possible to determine at least three different genetic causes of FHL, the most frequent being a deficiency of perforin. In this case the gene is named PRF1, the gene encoding

Munc13-4 protein and SH2D1A(XLP) (15). The presence of the genetic mutation in our patient was not established.

Central nervous system (CNS) involvement is frequently observed in HLH, manifested by irritability, meningitis, seizures, hypotonia, hypertonia, cranial nerve palsy, ataxia, blindness, altered consciousness, and coma. The brain imaging reveals white matter abnormalities, calcifications and/or demyelination, necrosis, and atrophy areas (16). Involvement in our patient was demonstrated by multiple white matter abnormalities in the MRI, and the presence of 40 cells/mm³ in the CSF. It is noteworthy to mention the complete resolution of this finding several months following SCT, an event that has been previously reported (16). Therefore, CNS affection does not necessarily represents a contraindication for SCT in HLH, despite the poorer long-term outcome associated with this complication (7, 16).

Currently SCT offers the only chance of curative treatment for most patients affected by HLH. However, as a result of their young age, only 20% or less of them have a matched sibling donor available (17). In the case reported here, we took advantage of the very uncommon finding of a 6/6 HLA compatibility between father and son, consequence of the close parental consanguinity. However, the absence of a matched sibling donor should not rule out HLH patients for SCT, since transplants from non-identical related donors have been practiced, including cord blood as the source of stem cells (6, 8).

Stem cell transplantation using a RIC regimen has been explored in the last decade as an alternative to traditional myeloablative regimens. Reduced-intensity conditioning regimens are associated with lower rates of severe toxicity, mainly in older patients, with very little experience in children published to date (18, 19).

On the other hand, standard myeloablative conditioning-regimens are related to early and late organ toxicities, specially in children, affecting fertility, as well as endocrine function, and growth impairment. Because of the young age of the majority of patients with HLH, these effects are particularly difficult to justify, leading to the administration of diminished doses of drugs, or the exclusion of etoposide and total body irradiation from the conditioning program (6–8, 20).

Immunosuppression without myeloablation in SCT can be sufficient to achieve complete donor chimerism, moreover a state of mixed chimerism is enough to restore a normal immune regulation and hence cure HLH (21). Also, a graft vs. disease effect has been clearly demonstrated in hematologic and non-hematologic malignancies (22). Both of these

advantages appear to have contributed to the excellent evolution in our patient. Finally, encouraging results have been recently published using SCT with RIC regimen for 12 cases of HLH, including three patients with CNS disease (21).

Given the reduced toxicity of SCT with RIC, it could represent an attractive additional transplant method for children with HLH, in whom myeloablation *per se* plays no role in disease eradication, and in whom a mixed chimeric state may be enough to cure the disease.

References

1. JANKA GE. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Eur J Pediatr* 1983;**140**:221–230.
2. ARICO M, JANKA G, FISCHER A, HENTER JI, BLANCHE S, ELINDER G, MARTINETTI M, RUSCA MP. Hemophagocytic lymphohistiocytosis. Report of 122 children from the International Registry. *Leukemia* 1996;**10**:197–203.
3. HENTER JI, ARICO M, ELINDER G, IMASHUKU S, JANKA G. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. Primary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998;**12**:417–433.
4. HENTER JI, ELINDER G, OST A. Diagnostic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. The FHL study group of the histiocyte society. *Semin Oncol* 1991;**18**:29–33.
5. HENTER JI, ARICO M, EGELER RM, *et al.* HLH-94: a treatment protocol for hemophagocytic lymphohistiocytosis. HLH study group of the histiocyte society. *Med Pediatr Oncol* 1997;**28**:342–347.
6. BAKER KS, DE LAAT CA, STEINBUCH M, GROSS TG, SHAPIRO RS, LOECHELT B, HARRIS R, FILIPOVICH AH. Successful correction of hemophagocytic lymphohistiocytosis with related or unrelated bone marrow transplantation. *Blood* 1997;**89**:3857–3863.
7. DURKEN M, FINCKENSTEIN FG, JANKA GE. Bone marrow transplantation in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Leuk Lymphoma* 2001;**41**:89–95.
8. JABADO N, DE GRAEFF-MEEDER ER, CAVAZZANA-CALVO M, HADDAD E, LE DEIST F, BENKERROU M, DUFOURCQ M, CAILLAT S, BLANCHE S, FISCHER A. Treatment of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis with bone marrow transplantation from HLA genetically nonidentical donors. *Blood* 1997;**90**:4743–4748.
9. JANKA GE, SCHNEIDER EM. Modern management of children with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol* 2004;**124**:4–14.
10. GONZALEZ O, MANCIAS C, CANTU OG, HERNANDEZ NE, QUIROGA A, HERRERA JL, JAIME JC, GOMEZ D. Bone marrow transplantation in a child with hemophagocytic lymphohistiocytosis using a less toxic conditioning regimen. *Arch Med Res* 1999;**30**:338–340.
11. GOMEZ D, RUIZ GJ, TARIN LC, GONZÁLEZ O, JAIME JC, LOPEZ B, CANTU OG, HERRERA JL. Reduced-intensity stem cell transplantation in children and adolescents: Te Mexican experience. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;**9**:157–161.
12. ARICO M, ALLEN M, BRUSA S, CLEMENTI R, PENDE D, MACCARIO R, MORETTA L, DANESINO C. Haemophagocytic lymphohistiocytosis: proposal of a diagnostic algorithm based on perforin expression. *Br J Haematol* 2002;**119**:180–188.
13. ARICO M, CLEMENTI R, CASELLI D, DANESINO C. Histiocytic disorders. *Hematol J* 2003;**4**:171–179.
14. JANKA GE, SCHNEIDER EM. Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) – state of the art. Histiocyte society 2005. <http://histio.org/society/HLH/index.shtml> 19-01-05.
15. FILIPOVICH A. Genetic testing for hemophagocytic lymphohistiocytosis. Histiocyte society 2005. <http://histio.org/society/HLH/index.shtml> 19 01 05.
16. HADDAD E, SULIS ML, JABADO N, BLANCHE S, FISCHER A, TARDIEU M. Frequency and severity of central nervous system lesions in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 1997;**89**:794–800.
17. SCHIPPER RF, D'AMARO J, OUDSHOORN M. The probability of finding a suitable related donor for bone marrow transplantation in extended families. *Blood* 1996;**87**:800–804.
18. GIRALT S, ESTEY E, ALBITAR M, *et al.* Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 1997;**89**:4531–4536.
19. SLAVIN S, NAGLER A, NAPARSTEK E, *et al.* Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 1998;**91**:756–763.
20. HALE GA, BOWMAN LC, WOODARD JP, *et al.* Allogeneic bone marrow transplantation for children with histiocytic disorders: use of TBI and omission of etoposide in the conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant* 2003;**31**:981–986.
21. COOPER N, RAO K, GILMOUR K, HADAD L, ADAMS S, CALE C, DAVIES G, WEBB D, VEYS P, AMROLIA P. Stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 2006;**107**:1233–1236.
22. SHENOY S, GROSSMAN WJ, DiPERSIO J, *et al.* A novel reduced-intensity stem cell transplant regimen for non-malignant disorders. *Bone Marrow Transplant* 2005;**35**:345–352.

PUBLICACIÓN 4 - TRADUCCIÓN

Trasplante exitoso de células madre de padre a hijo en un niño con linfocitosis hemofagocítica empleando un régimen de intensidad reducida.

González-Llano O, Jaime-Pérez J, Cantú-Rodríguez O, Mancías-Guerra C, Gutiérrez-Aguirre H, Herrera-Garza J, Gómez-Almaguer D.

Eur J Haematol 2006;77:341-344. Case Report.

Resumen

Objetivo. La linfocitosis hemofagocítica (LHH) es una enfermedad poco común y suele ser letal si no se realiza un trasplante alogénico de células madre (TCH).

Material y Métodos. reportamos el caso de un niño de 9 meses, el primer hijo de padres consanguíneos, diagnosticado con LHH y afectación neurológica demostrada por medio de imágenes de resonancia magnética (RM). Recibió un TCH alogénico de su padre que era genéticamente idéntico en el HLA. El trasplante se realizó después de recibir un régimen de acondicionamiento de intensidad reducida (RAIR) que consistía en el uso de ciclofosfamida, fludarabina y melfalan. Para prevenir la enfermedad injerto contra huésped (EICH) se indicó ciclosporina y metotrexato.

Resultados. En el día +20 se documentó una cuenta total de neutrófilos de $0.5 \times 10^9/L$, y en el día + 33 la cuenta plaquetaria fue $>20 \times 10^9/L$. El quimerismo completo del donante se demostró en el día +175. En el seguimiento se realizó una RM que se informó normal. Veinte meses después del trasplante el niño no mostró ninguna evidencia de LHH o actividad de EICH, además presentó un desarrollo psicomotor normal.

Conclusión. Por la toxicidad reducida del TCH con un RAIR, éste podría representar una atractiva opción de trasplante para niños con LHH en quienes la mieloablación no juega un papel importante en la erradicación de la enfermedad y en quienes un quimerismo mixto puede ser suficiente para la curación de la enfermedad.

Introducción

La linfocitosis hemofagocítica (LHH) es una rara enfermedad de origen no neoplásico y siempre fatal cuando no es tratada [1, 2]. Se conocen dos variedades que

resultan a veces difíciles de distinguir una de otra, una primaria o familiar que se hereda con un carácter autosómico recesivo, y una forma secundaria que ocurre de manera esporádica asociada a infecciones virales, neoplasias o inmunodeficiencias [3]. Rara vez se cura solo con la administración de quimioterapia, los protocolos de tratamiento que recomienda la Sociedad del Histiocito, y que incluyen dexametasona, etopósido, ciclosporina y metotrexato intratecal, han mejorado la supervivencia, pero su principal objetivo es lograr controlar y estabilizar la enfermedad para intentar curarla con un trasplante de células hematopoyéticas (TCH) [2, 5-9].

Reporte del Caso

Un lactante menor de tres meses, el primer hijo de una pareja de padres consanguíneos, acudió con una historia de siete días de fiebre, se encontraba pálido y con hepatoesplenomegalia (4 y 5 centímetros por debajo del reborde costal, respectivamente). La analítica demostró pancitopenia, deshidrogenasa láctica elevada, hipertrigliceridemia de 1130mg/dL y una ferritina sérica de 770ng/μL. En la médula ósea se observó hipocelularidad y una infiltración de histiocitos con hemofagocitosis, estableciéndose con todo lo anterior el diagnóstico de LHH familiar.

Inicialmente fue tratado con etopósido y dexametasona. Se obtuvo muy buena respuesta al tratamiento por lo que se continuó con el mismo esquema, el paciente presentó crisis convulsivas tres meses después del diagnóstico y se encontró en la resonancia magnética nuclear anomalías en la sustancia blanca de la corteza occipital y del tallo cerebral. El líquido cefalorraquídeo demostró la presencia de 40 células mononucleares/mm³. Tres semanas después se le agregó ciclosporina A, el paciente se estabilizó clínicamente y seis meses después del diagnóstico se llevó a cabo un TCH.

El donante fue su padre quien tenía un HLA idéntico al del paciente, fue estimulado durante tres días con factor estimulante de colonias granulocíticas a 5μg/Kg/día; las CH se obtuvieron de sangre periférica, infundiéndose 9x10⁶ células CD34+/Kg de peso del receptor. Se empleó un RAIR que consistió en fludarabina, ciclofosfamida y melfalan. La prevención

para la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) se llevó a cabo con ciclosporina y tres dosis de metotrexato.

El paciente presentó una neumonía en los primeros días después del TCH que se resolvió favorablemente, se documentó prendimiento de neutrófilos en el día +20, y de plaquetas en el día +33. Se evidenció EICH grado I con implicación intestinal que requirió cinco días de prednisolona con resolución completa del problema. Por medio de estudios de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) se estableció quimerismo completo en el día +175. La nueva resonancia magnética nuclear de cerebro en el día +260 fue normal. Casi dos años después del TCH el niño se encontraba sin evidencia de LHH ni de EICH y su desarrollo psicomotor era normal.

Discusión

Nuestro paciente cumplía con seis de los ocho criterios requeridos para el diagnóstico de LHH [4], se catalogó como forma familiar por el antecedente de consanguinidad y la edad temprana de aparición [5,9,12,13]. Actualmente es posible determinar al menos 3 causas genéticas de linfocitosis hemofagocítica familiar, la más frecuente es una deficiencia de perforinas.

La afectación del sistema nervioso central se puede manifestar con irritabilidad, meningitis, convulsiones, hipotonía, hipertonía, parálisis del nervio craneal, ataxia, ceguera, alteración de la conciencia y estado de coma. En los estudios de imagen se pueden observar anomalías como calcificaciones y/o desmielinización, necrosis y atrofia de alguna áreas [16]. De tal forma que la afectación neurológica en LHH no es de ninguna manera una contraindicación para llevar a cabo el TCH [7,16]. Ante la elevada probabilidad de no contar con un donante HLA idéntico y conociendo que el TCH es la única opción terapéutica curativa de la LHH, deben ser exploradas otras opciones de fuentes de las CH, como los donantes no emparentados y las unidades de sangre de cordón umbilical [6,8].

Los regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida fueron introducidos en el campo de los TCH a finales de la década de los ochenta, una de sus principales ventajas es la reducción en la incidencia de toxicidad grave y fueron inicialmente diseñados para pacientes

de edad avanzada en quienes un TCH mieloablativo convencional usualmente no podría realizarse por las altas tasas de morbilidad y mortalidad. [18, 19]

Recientemente han sido publicados reportes de TCH en niños utilizando RAIR; en LHH la toxicidad relacionada con los trasplantes mieloablativos, que incluyen alteraciones endócrinas y del crecimiento e infertilidad, cobran una mayor importancia debido a que la mayor parte de los pacientes con LHH son muy pequeños en el momento en el que se someten al TCH.

Por otro lado, también ha sido demostrado en estos trasplantes el efecto de injerto contra tumor, tanto en enfermedades malignas hematológicas como en las que no tienen este origen [22]. Parece razonable aceptar que ambas ventajas de los RAIR, el efecto inmunosupresor y el de injerto contra tumor, podrían explicar el buen resultado de nuestro paciente y también los obtenidos en los grupos de pacientes con esta patología que ya han sido descritos con estos esquemas [21].

Creemos que en los pacientes con LHH que requieren un TCH, es decir, aquellos con la variedad familiar o los casos de LHH secundaria que presentan recaídas al tratamiento convencional, debe ser considerado en primera instancia el uso de TCH con RAIR, habida cuenta de que los regímenes mieloablativos no parecen ser necesarios para la curación de esta enfermedad y podría, por lo tanto, ofrecerse el procedimiento con un menor grado de toxicidad a corto y largo plazo.

ORIGINAL ARTICLE

Outpatient allografting using non-myeloablative conditioning: the Mexican experience

OG Cantú-Rodríguez¹, JC Jaime-Pérez¹, CH Gutiérrez-Aguirre¹, O González-Llano¹, C Mancías-Guerra¹, LC Tarín-Arzaga¹, GJ Ruiz-Delgado¹, CC Sandoval-Villa¹, J Marfil-Rivera¹, A Morales-Toquero², GJ Ruiz-Argüelles² and D Gómez-Almaguer¹

¹Servicio de Hematología, Hospital Universitario 'Dr José Eleuterio González', Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México and ²Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla, Puebla, México

A group of 132 patients with both malignant and nonmalignant conditions was allografted using the 'Mexican' method of non-ablative conditioning. The conditioning was delivered on an outpatient basis and the procedure was planned to be conducted on outpatients in all cases. While 103 patients (78%) were able to complete the procedure totally as outpatients, 29 (22%) were hospitalized because of fever, mucositis or acute graft-versus-host disease. In a multivariate analysis, although differences were not statistically significant, it was found that the patients who were allografted as outpatients had higher levels of hemoglobin (12 versus 11.8 g/dl), higher platelet counts (248 versus $191 \times 10^9/l$), lower white blood cell counts (11.7 versus $12.4 \times 10^9/l$), higher Karnofsky scale scores (100 versus 90%) and lower creatinine levels (0.9 versus 0.93 mg/dl). A total of 86% of the patients with normal values for these variables could be allografted as outpatients, whereas only 67% of those with abnormal values completed the entire procedure as outpatients. It is concluded that allografting can be accomplished totally on an outpatient basis using the 'Mexican' reduced intensity-conditioning regimen.

Bone Marrow Transplantation (2007) 40, 119–123; doi:10.1038/sj.bmt.1705700; published online 28 May 2007

Keywords: outpatient; allogeneic; stem cell allografting; non-myeloablative

Introduction

Traditionally, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation has relied on intensive and toxic cytoreductive conditioning therapy, thus requiring 3–5 weeks of hospitalization for the treatment and management of various complications. The cost of this procedure is beyond the

reach of the majority of patients in the developing world;¹ furthermore, in Mexico, there are few hospitals with the traditional bone marrow transplantation unit designed to perform myeloablative allogeneic stem cell transplantation (ASCT). ASCT using reduced intensity conditioning or non-myeloablative stem cell transplantation (NST) has been developed to induce host versus graft transplantation tolerance with fast engraftment of donor stem cells and subsequently graft-versus-host and graft-versus-tumor effect.^{2,3} NST can be used in elderly individuals and other high-risk patients otherwise excluded from conventional allografting; furthermore, as it is more affordable, NST has become the method of choice in locations with limited resources.⁴

Several methods of conducting NST have been described worldwide; we have used the 'Mexican' method for the last 8 years.⁵ NST can be accomplished partially or totally on an outpatient basis because it leads to less toxicity; therefore neutropenia and the risk of infection are reduced.⁶ In a country like Mexico, where a significant percentage of the population does not have access to public social security or to sufficient funds to cover the cost of transplantation, the concept of employing cheaper effective procedures is very important to reach the goal of curing as many patients as possible.

One hundred and thirty-two patients were allografted using the 'Mexican' method. All of the procedures were started on outpatients, but some individuals had to be admitted to the hospital. In this article, we describe our experience and analyze certain characteristics of patients who were allografted totally as outpatients and compare them with those who were not, to identify variables, which could enable us to predict the feasibility of completing the allograft totally on an outpatient basis.

Materials and methods

Patients and donors

The study accrues all the patients given an allogeneic HSC transplant consecutively at the Hospital Universitario 'Dr José E González' (Monterrey, Mexico) and at the Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla (Puebla,

Correspondence: Dr D Gómez-Almaguer, Servicio de Hematología, Hospital Universitario UANL, París 3029 Col.Cumbres CP64610, Monterrey, Nuevo León, México.

E-mail: dr_gomez@infosel.net.mx

Received 15 January 2007; revised 13 March 2007; accepted 21 March 2007; published online 28 May 2007

México) from 1999 to 2005. In all instances, the donor was a human leukocyte antigen (HLA)-compatible (6/6) sibling. Institutional Review Board approval and written consent for an outpatient transplant was obtained from all the individuals. The hematology service in Monterrey is very similar to the Puebla service, both having a complete blood bank, laboratory and outpatient clinical facilities, including a 7-day a week clinic. Given the limited availability of funds to carry out conventional transplants and the simplification of the procedure utilizing non-myeloablative conditioning, this outpatient procedure is standard practice in our field. In all cases, patients were free to choose whether to receive the transplant as inpatients or outpatients; moreover, during the transplant, they could elect to be admitted to the hospital. Individuals with malignant and nonmalignant hematological conditions, as well as solid tumors, were included; all were required to have a Karnofsky score of at least 70%, serum creatinine levels of less than 2 mg/dl, a preserved oral route, a residence close to the hospital in a clean facility with telephone access and the permanent company of a caregiver (relative or friend) throughout the treatment. Hemoglobin (Hb) and platelet values were not used as selection criteria.

Other criteria used to determine the application of the ambulatory procedure were the availability of an area designated for the exclusive use of the patient within the residence, the appropriate educational level of both the patient and the caregiver, and both parties having complete instructions relating to the attention and controls to be observed during the procedure. This required deep involvement among the patient, his family and the transplant team.

Hematopoietic stem cell mobilization and apheresis

G-CSF (10 µg/kg/day) was delivered to the sibling donors on day -5 to +2. The apheresis procedures were performed on days 0, +1 and +2, according to cell counts with a Haemonetics V-50 PLUS machine (Haemonetics Corporation, Braintree, MA, USA) or a Baxter C-3000 PLUS machine (Baxter Healthcare, Deerfield, IL, USA), using the Spin-Nebraska protocol.⁷ About 5000–7000 ml of blood/m² were processed in each of the apheresis procedures to obtain a minimum of 5×10^8 mononuclear cells (MNCs) and/or $2\text{--}6 \times 10^6$ viable CD34 cells/kg of the recipient. Enumeration of the total white blood, MNC and CD34-positive cells was carried out by flow cytometry in an EPICS Elite ESP apparatus (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA), using the anti-CD34 monoclonal antibody HPCA-2 (Becton Dickinson, San José CA, USA).^{8,9} No purging procedures were performed.

Conditioning and grafting

The 'Mexican' NST conditioning regimen was employed,^{5,10–12} which is a simplification of the low-intensity conditioning regimens used in Houston by Giralt *et al.*¹³ and in Jerusalem by Slavin *et al.*⁷ Oral busulfan, 4 mg/kg was delivered on days -6 and -5; intravenous (i.v.) cyclophosphamide, 350 mg/m² on days -4, -3 and -2; i.v. fludarabine, 30 mg/m² on days -4, -3 and -2; oral cyclosporin A (CyA) 5 mg/kg was started on day -1 and i.v. methotrexate (5 mg/m²) was delivered on days +1, +3,

+5 and +11. Conditioning was not given in the hospital; patients received chemotherapy at the outpatient clinic and were discharged after the procedure. Between the start of the conditioning regimen and reaching a granulocyte count above $0.5 \times 10^9/l$, the patients were examined in the outpatient clinic on a daily basis. All of them were instructed to report the presence of fever ($>38^\circ\text{C}$), oral intolerance, diarrhea, jaundice, bleeding or any other abnormality. Hospital beds were kept available for those patients needing admission. During outpatient surveillance, patients received only oral drugs: Ondansetron (1 mg p.o. every 12 h for 2 days after i.v. chemotherapy), ciprofloxacin (500 mg b.i.d.), fluconazole (100 mg b.i.d.) and acyclovir (400 mg b.i.d.). The oral route was switched to i.v. only if patients were admitted to the hospital. The products of PBSC apheresis were reinfused as an outpatient procedure on days 0–2 according to the CD34 cell yield (*vide supra*). Oral CyA was continued through day 180 with adjustments according to whole blood CyA levels; it was then tapered over 30–60 days. If GVHD data were present, the CyA tapering was carried out over longer periods. Red blood cell transfusions were given if the patient had a Hb level below 8.0 g/dl, and apheresis platelets were given if the platelet count (Plt) fell below $20 \times 10^9/l$ or if there were signs of bleeding.

Patient surveillance was carried out by physicians on the transplantation teams. All patients had a caregiver at home (a relative or friend) who took care of food preparation, assisted in personal hygiene, controlled the scheduling and dosage of the prescribed medicine (only oral) and was alert to any complication that required medical attention. In the case of patients from the Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla, the expenses of transplantation were fully covered by the patients themselves. For the rest of the patients, expenses were covered by government funds drawn from the social security system. Transportation expenses were covered by the patients themselves.

Molecular biology studies

In cases of a sex mismatch, a fluorescent *in situ* hybridization technique was carried out to demonstrate the X and Y chromosomes, whereas restriction fragment length polymorphism studies in the peripheral blood lymphocytes were used in the other cases.^{14,15} These studies were carried out at diagnosis, 15, 30 and 60 days following the allograft, and every 2–6 months afterwards.¹⁵

Statistical analysis

Both univariate and multivariate analysis was used. The Kaplan–Meier method was employed to estimate the cumulative incidence for overall survival and compared with the log rank test.

Results

Patients

The study involved 132 patients, 82 men and 50 women with a median age of 36 years (range 8–61). Both hematological and non-hematological malignancies were included, as well

as nonmalignant hematological diseases. Table 1 shows the distribution of diseases that led to the allograft. Karnofsky score values in all patients were 70% or greater.

Conditioning

Oral busulphan and i.v. cyclophosphamide and fludarabine were delivered on an outpatient basis to all patients according to the conditioning regimen described previously^{5,6,8-12} as well as antiemetic and prophylactic antibiotics. All of the 132 individuals started the allografting procedure on an outpatient basis, of whom 103 (78%) completed the procedure without being admitted to the hospital (group A). No infections were suspected or detected in this group. Only 29 (22%) patients were admitted to the hospital because of fever, mucositis, acute graft-versus-host disease (GVHD) or some other complication, of whom 17 were given i.v. broad spectrum antibiotics (group B). There was only one death before engraftment in group B. This patient had myelodysplastic syndrome and was admitted at day +3 with a fever that lasted 4 h. She received antibiotics and exhibited a transitory improvement on day +5, but she eventually deteriorated and died on day +11 as a result of multiorgan failure. There was no infection site detected during her admission evaluation. The CBC showed pancytopenia and fewer than $0.5 \times 10^9/l$ neutrophils while the biochemical profile was normal, as were the heart and lung functions.

Analysis of variables

Several variables were analyzed in the two groups when the allografting procedure began: diagnosis, Hb levels, white blood cell count (WBC), Plt, Karnofsky score and serum creatinine levels (Table 2).

Group A. In this group of 103 patients, 91 were allografted as a result of malignancy while 12 had a nonmalignant condition. Packed red cell transfusions were used ranging from 0 to 2 with a median of 0; likewise, the apheresis platelet transfusion ranged from 0 to 2 with a median of 0.

Group B. In this group of 29 patients, 23 were allografted as a result of a malignancy while 6 had a nonmalignant condition. Ten patients were admitted to the hospital because of fever, eight as a result of severe mucositis, nine

Table 1 Distribution of the diseases that led to allograft using the 'Mexican' non-myceloablative conditioning regimen

Chronic myelogenous leukemia	34
Acute myeloblastic leukemia	30
Acute lymphoblastic leukemia	27
Non-Hodgkin's lymphoma	7
Myelodysplastic syndrome	7
Aplastic anemia	5
Hodgkin's disease	5
Other malignant disease	4
Multiple myeloma	3
Chronic lymphocytic leukemia	2
Thalassemia	2
Pure red cell aplasia	2
Myelofibrosis	2
Diamond Blackfan syndrome	1
Hunter's disease	1

with fever and mucositis and two because of acute GVHD. The median number of days of hospital stay was 11 (range 4-24 days). The packed red cell transfusions ranged from 0 to 2 with a median of 0, while the apheresis platelet transfusions ranged from 1 to 2 with a median of 1.

Differences

When the allograft procedure was initiated, Hb values were higher for patients in group A (outpatient allografting) than for those in group B ($P > 0.05$). WBC values were lower for patients in group A than for those in group B ($P > 0.05$), while Plt values were higher for patients in group A than for those in group B ($P = 0.037$). By the same token, creatinine levels were lower in group A ($P > 0.05$), and Karnofsky scores higher in group A ($P > 0.05$). We found that 85.7% of a subset of 42 patients with totally normal values of Hb, WBC, Plt, creatinine and high Karnofsky scores could be allografted outside the hospital, whereas only 67% of a subset of patients with abnormal values for all these variables could complete the procedure totally as outpatients. Table 2 summarizes these data. According to the Kaplan-Meier method (Figure 1), the overall survival of patients in group A was also better than that of patients

Table 2 Differences in variables of the patients who could be allografted totally as outpatients (group A) and those who had to be admitted to the hospital (group B)

	Group A (outpatients)	Group B (inpatients)	P-value
<i>n</i>	103	29	
Age, years	34 (1-71)	32 (11-56)	> 0.05
Hb (g/dl)	12 (7.3-18.4)	11.8 (6.8-15.8)	> 0.05
WBC ($\times 10^9/l$)	11.7 (0-56)	12.4 (0-32)	> 0.05
Plt ($\times 10^9/l$)	248 (8-1650)	191 (1-1200)	0.03
Creatinine (mg/dl)	0.9 (0.63-1.1)	0.93 (0.54-2.0)	> 0.05
Karnofsky (%)	100 (80-100)	90 (70-100)	> 0.05
Malignancy (%)	88	79	> 0.05

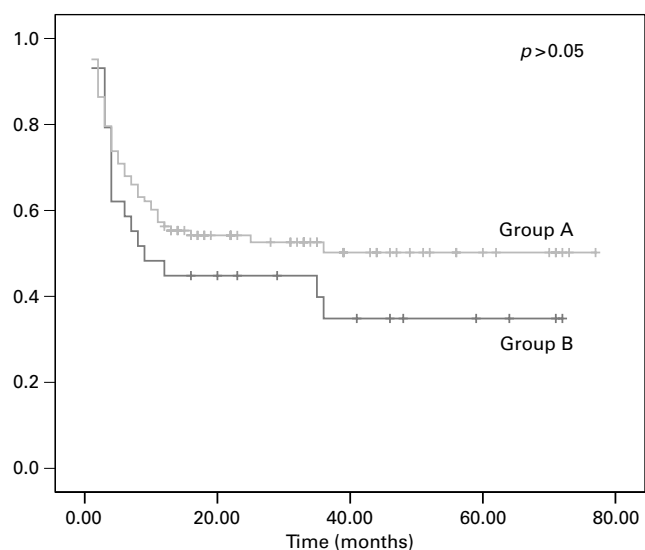


Figure 1 Overall survival of the patients allografted, using the 'Mexican' non-ablative conditioning regimen, who could be allografted totally as outpatients (group A) and those who had to be admitted to the hospital (group B). The differences are not statistically significant.

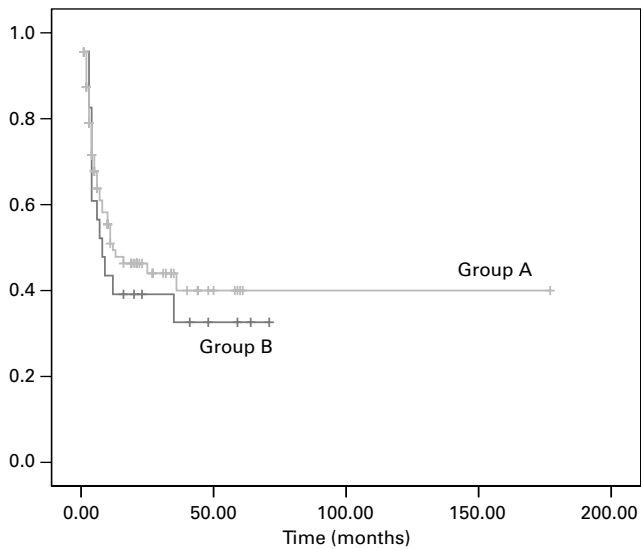


Figure 2 Overall survival of the patients with diagnosis of malignant disease, allografted totally as outpatients (group A) and those who had to be admitted to the hospital (group B). The differences are not statistically significant ($P > 0.05$).

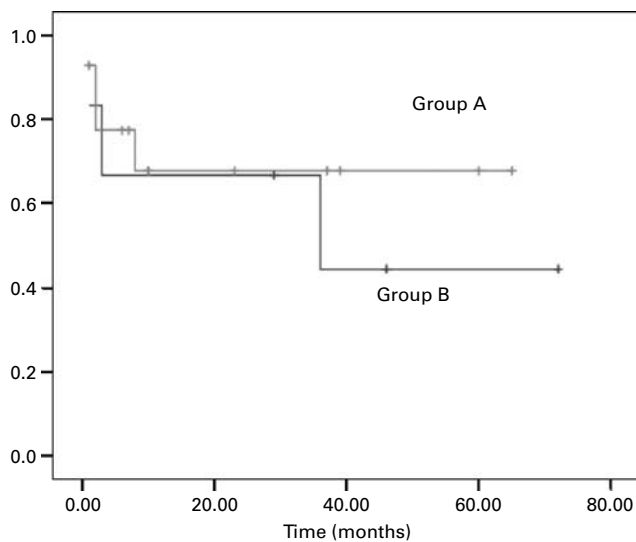


Figure 3 Overall survival of the patients with diagnosis of nonmalignant disease allografted totally as outpatients (group A) and those who had to be admitted to the hospital (group B). The differences are not statistically significant ($P > 0.05$).

in group B; however, the difference was not statistically significant. The same is true for patients with malignant and nonmalignant diseases (Figures 2 and 3). A quality of life test was applied with the COOP/WONCA tests, in which the outpatient group referred to a better quality of life in terms of health status and daily work activity, but no statistical difference was found when compared with the inpatient group.

Discussion

Currently, allogeneic and autologous HSC transplantations are the treatment of choice for several malignant and

nonmalignant blood disorders. The development of effective control of GVHD, antiviral and antifungal drugs and the shift to outpatient care have resulted in an important reduction in the cost of transplantation in the developed world. However, the cost of conventional transplantation using a special bone marrow transplantation hospital unit and a standard myeloablative conditioning regimen is still unaffordable for the majority of patients living in the developing world.¹⁶ México is a country with 110 million inhabitants where more than 50% have a low income; as a result, very few traditional ablative bone marrow transplantation units for inpatient treatment are available.

There is little information about the outpatient conduction of ASCT. Most papers dealing with this topic refer to autologous transplantation.^{1,17-19} Svahn *et al.*²⁰ studied the long-term follow-up of patients treated at home during the pancytopenic phase after myeloablative allogeneic HSC transplantation. In this study, the conditioning regimen was given in the hospital, and after graft infusion the patient could go home where an experienced nurse provided daily care. Researchers found several advantages for the patient in addition to the reduced risk of acute GVHD and toxic related mortality; fewer days on parenteral nutrition, earlier discharge to the outpatient clinic, increased comfort level of staying with the family and lower cost of home care compared to hospital care.

In an effort to deliver effective treatments to a larger number of patients, we have been studying changes in the therapeutic approaches of hematological diseases that could result in both simplification and cost reduction in the procedures.⁵ In a pilot study conducted during 2000, we showed that allogeneic HSC transplantation could be performed safely on an outpatient basis. In contrast to the study of Svahn *et al.*, these transplants were performed totally on an outpatient basis using a low-intensity preparative regimen.⁶ Since then, we have been allografting individuals almost exclusively on an outpatient basis. We have found that some of these patients have to be admitted to the hospital, mainly for fever in the presence of neutropenia, mucositis or grade III and IV GVHD. In the present study, 103 out of 132 patients could be allografted in an outpatient setting without admittance to the hospital; this group of patients had normal or nearly normal CBC, creatinine and high Karnofsky scores. Interestingly, age by itself was not found to be a critical factor in predicting the outpatient performance of the allograft, since the median age for patients allografted outside the hospital was 34 years and for those eventually admitted was 32 years. The Plt was somewhat predictive in the multivariate analysis ($P < 0.05$), but the median Plt was normal in both groups. Owing to the small numbers in the inpatient group, we were unable to show statistically significant differences between both groups. Of the group of 29 patients who had to be admitted to the hospital, 10 were admitted for fever, 17 for mucositis (nine had both fever and mucositis) and only two as a result of GVHD. These individuals stayed at the hospital for a median of 11 days with a range of 4-24 days. Related to this, Subirá *et al.*⁴ in Spain were able to show that the length of inpatient days could be reduced from 29 to 9 in a group of 41 patients allografted if reduced-intensity conditioning

methods were used. Recently, Leger *et al.*¹⁹ have published their experience with 60 patients with follicular lymphoma and autologous transplantation; only 6 were well enough to be treated solely in the outpatient setting and 90% required at least one inpatient admission (median 7 days).

The outpatient allografting program cannot be offered indiscriminately to all patients requiring a SCT; it is optimal for those asymptomatic, fully active, able to stay in their homes with trained caregivers (relatives or friends) or in nearby hotels and those with an adequate educational level. Fundamental to the success of the outpatient approach is the availability of the 7 day-a-week clinic where medications and transfusions can be rapidly and efficiently provided for cytopenias, if required.⁶

In conclusion, we have shown that allografting on a totally outpatient basis is safe, effective and feasible for patients with appropriate physical condition using the 'Mexican' approach of ASCT.

References

- 1 Summers N, Dawe U, Stewart DA. A comparison of inpatient and outpatient ASCT. *Bone Marrow Transplant* 2000; **26**: 389–395.
- 2 Georges G, Storb R. Review of 'minitransplantation': non-myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* 2003; **77**: 3–14.
- 3 Djulbegovic B, Seidenfeld J, Bonnell C, Kumar A. Nonmyeloablative allogeneic stem-cell transplantation for hematologic malignancies: a systematic review. *Cancer Control* 2003; **10**: 17–31.
- 4 Subirá M, Sureda A, Ancín I, Martino R, Altés A, Burnet S *et al.* Allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning is potentially feasible as an outpatient procedure. *Bone Marrow Transplant* 2003; **32**: 869–872.
- 5 Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles A, González-Llano O, Cantú OG, Jaime-Pérez JC. Results of an outpatient-based stem cell allotransplant program using non-myeloablative conditioning regimens. *Am J Hematol* 2001; **66**: 241–244.
- 6 Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Argüelles A, González-Llano O, Cantú OE, Hernández NE. Hematopoietic stem cell allografts using a non-myeloablative conditioning regimen can be safely performed on an outpatient basis. *Bone Marrow Transplant* 2000; **25**: 131–133.
- 7 Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G *et al.* Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematological diseases. *Blood* 1998; **91**: 756–763.
- 8 Ruiz-Argüelles A. Flow cytometry in the clinical laboratory. Principles, applications and problems. *Ann Biol Clin* 1992; **50**: 735–743.
- 9 Ruiz-Argüelles A, Orfao A. Caracterización y evaluación de células totipotenciales en sangre periférica y médula ósea. In: Ruiz-Argüelles GJ, San-Miguel JF (eds). *Actualización en Leucemias*. Editorial Médica Panamericana: México City, 1996, pp 79–82.
- 10 Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Almaguer D, López-Martínez B, Cantú-Rodríguez OG, Jaime-Pérez JC, González-Llano O. Results of an allogeneic non-myeloablative stem cell transplantation program in patients with chronic myelogenous leukemia. *Haematologica* 2002; **87**: 894–896.
- 11 Ruiz-Argüelles GJ. Allogeneic stem cell transplantation using non-myeloablative conditioning regimens: results of the Mexican approach. *Int J Hematol* 2002; **76** (Suppl 1): 376–379.
- 12 Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles GJ, Tarín-Arzaga LC, González-Llano O, Jaime-Pérez JC, López-Martínez B *et al.* Reduced-intensity stem cell transplantation in children and adolescents: the Mexican experience. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; **9**: 157–161.
- 13 Giralt S, Estey E, Albitar M, van Besien K, Rodon G, Andreolini P *et al.* Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 1997; **89**: 4531–4536.
- 14 Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 2934–2938.
- 15 Ruiz-Argüelles GJ, López-Martínez B, Santellán-Olea MR, Abreu-Díaz G, Reyes-Núñez V, Ruiz-Argüelles A *et al.* Follow up of hemopoietic chimerism in individuals given allogeneic hemopoietic stem cell allografts using an immunosuppressive, non-myeloablative conditioning regimen: a prospective study in a single institution. *Leukemia Lymph* 2002; **43**: 1509–1511.
- 16 Gómez-Almaguer D. The simplification of the SCT procedures in developing countries has resulted in cost-lowering and availability to more patients. *Int J Hematol* 2002; **76** (Suppl 1): 380–382.
- 17 Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Smith DM, Weisenburger DD. Autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation restores hemopoietic function following marrow ablative therapy. *Blood* 1998; **71**: 723–727.
- 18 Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Argüelles A, Pérez-Romano B, Marín-López A, Delgado-Lamas JL. Non-cryopreserved peripheral blood stem cells autotransplants for hematological malignancies can be performed entirely on an outpatient basis. *Am J Hematol* 1998; **58**: 161–164.
- 19 Leger C, Sabloff M, McDiarmid S, Bence-Bruckler I, Atkins H, Bredeson C *et al.* Outpatient autologous hematopoietic stem cell transplantation for patients with relapsed follicular lymphoma. *Ann Hematol* 2006; **85**: 723–729.
- 20 Svahn BM, Ringdén O, Remberger M. Long-term follow-up of patients treated at home during the pancytopenic phase after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2005; **36**: 511–516.

PUBLICACIÓN 5 - TRADUCCIÓN

Aloinjerto ambulatorio utilizando un acondicionamiento no mieloablativo: la experiencia mexicana.

Cantú-Rodríguez OG, Jaime-Pérez JC, Gutiérrez-Aguirre CH, González-Llano O, Mancías-Guerra C, Tarín-Arzaga LC, Ruiz-Delgado GJ, Sandoval-Villa CC, Marfil-Rivera J, Morales-Toquero A, Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Almaguer D.

Bone Marrow Transplantation 2007;40:119–123.

Un grupo de 132 pacientes, tanto con enfermedades malignas como no neoplásicas, fue aloinjertado utilizando el método “mexicano” de acondicionamiento no mieloablativo. El acondicionamiento se llevó a cabo de manera ambulatoria, planeándose así en todos los casos. Mientras que 103 de los pacientes (78%) pudieron completar todo el procedimiento como pacientes ambulatorios, 29 (22%) fueron hospitalizados por fiebre, mucositis o enfermedad injerto contra huésped aguda. En un análisis multivariado las diferencias no fueron estadísticamente significativas; sin embargo, se encontró que los pacientes que se sometieron a un aloinjerto ambulatorio tenían niveles más altos de hemoglobina (12 vs 11.8g/dl), una cuenta plaquetaria mayor (248 vs 191x10⁹/L), menor cantidad en la cuenta de leucocitos (11.7 vs 12.4x10⁹/L), mejor puntaje en la escala de Karnofsky (100 vs 90%) y menores niveles de creatinina (0.9 vs 0.93mg/dl). Un 86% de los pacientes con niveles normales para estas variables pudieron ser aloinjertados como pacientes ambulatorios, mientras que sólo el 67% de los pacientes con valores anormales pudieron completar el procedimiento como pacientes ambulatorios. Podemos concluir que los aloinjertos se pueden llevar a cabo de manera totalmente ambulatoria utilizando el régimen de acondicionamiento de intensidad reducida “mexicano”.

Introducción

Tradicionalmente el trasplante alogénico de células hematopoyéticas se ha apoyado en un esquema de acondicionamiento intensivo y con toxicidad citorreductora, requiriendo hospitalización de 3 a 5 semanas para el tratamiento y manejo de las complicaciones. El coste de este procedimiento está más allá del alcance de la mayoría de los pacientes de países en desarrollo [1]; además, en México solo existen algunos hospitales con las unidades tradicionales de trasplante de médula ósea diseñadas para realizar trasplantes alogénicos de

células hematopoyéticas mieloablativos (TCH). Se ha desarrollado el TCH de intensidad reducida o no mieloablativo (TNM) para inducir el desarrollo de EICH y de tolerancia del huésped contra el injerto, con un rápido prendimiento de las células del donante y el subsecuente efecto de injerto contra tumor [2-3].

El TNM puede realizarse de manera ambulatoria total o parcialmente, traduciéndose en menor toxicidad y por lo tanto menor riesgo de neutropenia y de adquirir infecciones [6]. En un país como México, donde existe un porcentaje muy alto de la población que no tiene acceso al servicio público de seguridad social, o no cuenta con los suficientes recursos para cubrir un trasplante, la idea de realizar procedimientos más baratos y efectivos es muy importante para alcanzar la meta de curar a tantos pacientes como sea posible.

Material y Métodos.

Pacientes y donadores. En este estudio se incluyó a todos los pacientes a los que de manera consecutiva se les practicó un TCH en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” (Monterrey, México) y en el Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla (Puebla, México), entre 1999 y 2005. En todos los casos el donante fue un hermano HLA idéntico. Se incluyó a pacientes tanto con enfermedades malignas, incluyendo tumores sólidos, como con patologías no neoplásicas que cumplieran con las siguientes características: puntuación en la escala de Karnofsky de al menos 70%, nivel sérico de creatinina menor de 2mg/dl, vía oral preservada, residencia próxima al hospital en un sitio limpio, con acceso telefónico, y con acompañante de manera permanente (un familiar o amigo).

Otros criterios que se utilizaron para determinar si podían ser pacientes ambulatorios incluían la disponibilidad en su vivienda de una área exclusiva para el uso del paciente, un nivel apropiado de educación, tanto del paciente como del cuidador, y que ambos tuvieran las instrucciones completas en relación a la atención y el control de las necesidades del paciente durante el procedimiento.

Mobilización de células hematopoyéticas y aféresis. Los donantes recibieron 10µg/Kg/día de factor estimulante de colonias granulocíticas (FEC-G) durante los días -5 a +2. La cuantificación de leucocitos, MNC y células CD34+ se realizó por citometría de flujo.

Acondicionamiento y prendimiento. El TNM se llevó a cabo con el régimen de acondicionamiento del método "mexicano", [5, 10-12] el cual es una simplificación del régimen de acondicionamiento de intensidad reducida utilizado en Houston por Giralt *et al.* [13] y en Jerusalén por Slavin *et al.* [7]. Se administró busulfan oral en los días -6 y -5 a 4mg/Kg, ciclofosfamida intravenosa en los días -4, -3 y -2 a 350mg/m² y fludarabina intravenosa a 30 mg/m² en los días -4, -3 y -2, la ciclosporina A por vía oral se inició en el día -1 a 5mg/Kg y metotrexato intravenoso en los días +1, +3, +5 y +11 a 5mg/m². El acondicionamiento fue administrado de manera ambulatoria y los pacientes se retiraban a su casa después del procedimiento. Entre el inicio del régimen de acondicionamiento y hasta alcanzar una cuenta de granulocitos >0.5x10⁹/L, los pacientes se atendían diariamente en la clínica ambulatoria. Todos ellos recibieron la instrucción de reportar la presencia de fiebre (>38º), intolerancia a la vía oral, diarrea, ictericia, sangrado o cualquier otra anomalía. Se realizaron transfusiones si los pacientes mostraban niveles de hemoglobina menores de 8.0mg/dl y plaquetas menores de 20x10⁹/L o si existían datos de sangrado.

La vigilancia del paciente se llevó a cabo por los médicos del equipo de trasplante. Todos los pacientes tenían un cuidador en casa (un familiar o amigo) que se hacía cargo de la preparación de la comida, del apoyo en la higiene personal, del control de los horarios y las dosis de los medicamentos (sólo orales) y estaba pendiente de cualquier complicación que se presentara y que necesitara de asistencia médica.

Estudios de biología molecular. En los casos sin concordancia de género se realizó la técnica de hibridación *in situ* fluorescente para demostrar la presencia de los cromosomas X e Y [14, 15], mientras que en los otros casos se utilizaron estudios de polimorfismo de fragmentos de restricción en linfocitos de sangre periférica.

Análisis estadístico. Se realizaron análisis univariado y multivariado. El método de Kaplan-Mier se utilizó para estimar la incidencia acumulada y la supervivencia global, y se comparó con la prueba de rango logarítmico.

Resultados

Pacientes. Se incluyeron 132 pacientes en este estudio, 82 hombres y 50 mujeres, con una mediana de edad de 36 años (rango 8-61). Se realizó el procedimiento a pacientes con enfermedades malignas, tanto hematológicas como no hematológicas, así como con enfermedades hematológicas no malignas.

Acondicionamiento. Se les administró a todos los pacientes busulfan oral y ciclofosfamida y fludarabina intravenosas de acuerdo al régimen de acondicionamiento descrito previamente [5, 6, 8-12], así como antieméticos y antibióticos profilácticos. Los 132 pacientes iniciaron el procedimiento como pacientes ambulatorios, de los cuales 103 (78%) completaron el procedimiento sin necesidad de ser ingresados en el hospital (grupo A). No se sospecharon o diagnosticaron infecciones en este grupo. 29 pacientes (22%) ingresaron en el hospital por fiebre, mucositis, EICH aguda o alguna otra complicación, a 17 se les administró antibióticos de amplio espectro (grupo B). Solo hubo una muerte antes de alcanzar el prendimiento en los pacientes del grupo B.

Análisis de variables. Al inicio del trasplante se analizaron distintas variables en ambos grupos: diagnóstico, niveles de hemoglobina, cuenta de leucocitos y plaquetas, puntaje de la escala de Karnofsky y niveles séricos de creatinina (tabla 2).

- *Grupo A.* En este grupo de 103 pacientes, 91 fueron trasplantados por enfermedad maligna y 12 tenían una enfermedad no neoplásica. La mediana de transfusiones fue de 0 con un rango de 0 a 2, la mediana de transfusión de plaquetoféresis fue de 0 con un rango de 0 a 2.
- *Grupo B.* En este grupo de 29 pacientes, 23 se trasplantaron por enfermedades malignas, mientras que los otros 6 tenían una enfermedad no neoplásica. Diez pacientes ingresaron por fiebre, ocho por mucositis grave, nueve por fiebre y mucositis y dos por EICH aguda.

La mediana de los días de hospitalización fue de 11 (rango de 4-24 días). Las transfusiones de eritrocitos mostraron una mediana de 0 con rango de 0 a 2 y las de plaquetoféresis, una mediana de 1 con rango de 1 a 2.

Diferencias. En el 85.7% de los pacientes con valores completamente normales de hemoglobina, leucocitos, plaquetas, creatinina y puntajes altos en la escala de Karnofsky se pudo realizar el trasplante de manera totalmente ambulatoria; mientras que el 67% de los pacientes con valores anormales pudo completar el procedimiento como paciente ambulatorio. En la tabla 2 se resume esta información. De acuerdo al método de Kaplan Meier, la tasa de supervivencia global de los pacientes del grupo A fue también mejor que en los pacientes del grupo B, sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa. Lo mismo ocurrió entre los pacientes con una enfermedad maligna y con una enfermedad no neoplásica (figuras 2 y 3).

Discusión

El desarrollo en el control de la EICH, el uso de medicamentos antimicóticos y antivirales y el cambio a un tratamiento ambulatorio han resultado de importancia para la reducción de los costes de un trasplante en un país en vías de desarrollo. México es un país con 110 millones de habitantes, donde más del 50% de la población tiene un ingreso económico bajo, además, existen muy pocos hospitales que cuenten con las unidades especializadas para practicar los trasplantes mieloablativos convencionales que se hacen con el paciente ingresado en el hospital.

Existe poca información sobre cómo deben llevarse a cabo los TCH ambulatorios. Las escasas publicaciones que existen se refieren a la práctica ambulatoria en trasplantes autólogos [1, 17-19]. Svahn *et al.* [20] estudiaron, con un seguimiento a largo plazo, pacientes tratados en casa durante la fase de pancitopenia después de haber recibido un TCH mieloablativo. En este estudio el régimen de acondicionamiento se administró en el hospital y, después de infundir las células, el paciente se podía ir a casa, una enfermera experimentada lo atendía allí diariamente. Los investigadores encontraron distintas ventajas para el paciente, además se redujeron los riesgos de EICH y la mortalidad relacionada a toxicidad; por ejemplo, menos días de nutrición parenteral, alta temprana a la clínica ambulatoria, incremento de los niveles de comodidad al permanecer con la familia y menores costes, si se comparan los cuidados en casa con los del hospital.

A diferencia del estudio de Svahn *et al.*, estos trasplantes se realizaron totalmente de manera ambulatoria utilizando un régimen de acondicionamiento de intensidad reducida [6]. Desde entonces estamos realizando trasplantes casi exclusivamente de esta forma. Hemos encontrado que algunos pacientes sí necesitan ser internados en el hospital, principalmente por la presencia de fiebre, neutropenia, mucositis y EICH de grados III y IV. Debido al pequeño número de pacientes, no pudimos demostrar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Del grupo de los 29 pacientes que fueron ingresados en el hospital, 10 lo hicieron por fiebre, 17 por mucositis (9 de ellos tuvieron ambas) y sólo 2 como resultado de EICH. Estos pacientes tuvieron una hospitalización con una mediana de 11 días con un rango de 4 a 24 días. En este sentido, Subirá *et al.*, [4] en España, pudieron demostrar que la duración de la estancia hospitalaria podía ser reducida de 29 a 9 días en un grupo de 41 pacientes que se sometieron a un trasplante con régimen de acondicionamiento de intensidad reducida.

El programa ambulatorio no puede ofrecerse indiscriminadamente a todos los pacientes que necesiten un trasplante; es óptimo para aquellos pacientes asintomáticos, totalmente activos y que tengan la capacidad de quedarse en casa o en hoteles cercanos con cuidadores entrenados (familiares o amigos) y que tengan un nivel educativo adecuado.

Alemtuzumab for the Treatment of Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease

David Gómez-Almaguer,¹ Guillermo J. Ruiz-Argüelles,² Luz del Carmen Tarín-Arzaga,¹
Oscar González-Llano,¹ Homero Gutiérrez-Aguirre,¹ Olga Cantú-Rodríguez,¹ José Jaime-Pérez,¹
Antonio Carrasco-Yalán,³ Sergio Giralt⁴

¹Servicio de Hematología, Hospital Universitario "Dr. José E. González," Universidad Autónoma Nuevo León, Monterrey, NL, México; ²Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla, Puebla, México; ³Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, Lima, Peru; and ⁴M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas

Correspondence and reprint requests: David Gómez-Almaguer, MD, Hematology Department, University Hospital, UANL, Av. Madero y Gonzalitos s/n, Col. Mitras Centro CP 64460, Monterrey, NL, México (e-mail: dr_gomez@infosel.net.mx).

Received August 23, 2007; accepted October 16, 2007

ABSTRACT

The treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease (aGVHD) remains a clinical challenge, for which no standard therapy exists. Alemtuzumab is a humanized anti-CD52 monoclonal antibody (mAb) that has been successfully used as part of conditioning regimens for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) to prevent GVHD. The purpose of this study was to evaluate the safety and efficacy of alemtuzumab in treating steroid-refractory aGVHD (\geq grade II) following HSCT. Eighteen patients received subcutaneous alemtuzumab 10 mg daily on 5 consecutive days. Response was assessed at day 28 following initiation of alemtuzumab. Eight patients had grade II aGVHD, 8 had grade III, and 2 had grade IV. The main organ involved was the liver in 4 patients, gastrointestinal (GI) tract in 5, skin in 3, skin and liver in 3, and skin and GI tract in 3. Fifteen patients (83%) responded to alemtuzumab, including 6 (33%) with complete response. All 3 unresponsive patients died of GVHD. Ten of 15 responders are alive at median follow-up of 11 months (range: 3-24). Infections occurred in 14 patients, including cytomegalovirus (CMV) reactivation in 11. Grade 3 neutropenia and thrombocytopenia occurred in 6 and 4 patients, respectively. Alemtuzumab was well tolerated, and induces promising response rates in steroid-refractory aGVHD.

© 2008 American Society for Blood and Marrow Transplantation

KEY WORDS

Acute GVHD • Alemtuzumab • Campath-1H • Monoclonal antibody • Stem cell transplantation • Steroid refractory

INTRODUCTION

Graft-versus-host disease (GVHD) remains an important cause of mortality of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). The incidence of acute GVHD (aGVHD) may vary from 20% to 70%, depending on several factors [1-2]. Corticosteroids are the current standard initial treatment for aGVHD, with approximately 50% of patients achieving an initial response [3-5]. However, no consensus exists on the optimal treatment of patients who are unresponsive or refractory to steroid therapy. To date, a number of therapeutic agents have been evaluated for the treatment of steroid-refractory GVHD,

including high-dose corticosteroids, antithymocyte globulin (ATG), mycophenolate mofetil (MMF), tacrolimus, sirolimus, pentostatin, etanercept, and a variety of monoclonal antibodies (mAbs) [6-14].

Alemtuzumab (Campath-1H) is an unconjugated, humanized IgG1 kappa mAb that targets the CD52 antigen expressed on T and B lymphocytes, monocytes, monocyte-derived dendritic cells, macrophages, and eosinophils [15-20]. The Campath-1 family of antibodies was initially developed in the early 1980s as T cell-depleting (TCD) agents to prevent GVHD in the allogeneic HSCT setting [18,21]. Alemtuzumab is currently indicated for the treatment of patients with fludarabine-refractory B cell chronic lymphocytic

leukemia (CLL) [15,22]. Data from recent studies suggest the potential role of alemtuzumab in minimizing GVHD when used as part of the conditioning regimen for allogeneic HSCT [23-27]. In addition, alemtuzumab has been used successfully to treat established steroid-refractory, severe aGVHD, although only anecdotal data are available [28-30]. Based on these data, we conducted a prospective clinical study to evaluate the safety and efficacy of alemtuzumab in the treatment of steroid-refractory aGVHD in a cohort of 18 allografted patients.

PATIENTS AND METHODS

Eligibility Criteria

Patients were eligible if they had received allo-HSCT from either family donors or unrelated cord blood cells, and had a diagnosis of \geq grade II aGVHD refractory to corticosteroid therapy, as defined by the Consensus criteria [31]. Patients with uncontrolled infections, cardiac failure, or serum creatinine \geq 2 mg/dL or who were receiving immunosuppressive agents other than calcineurin inhibitors and corticosteroids were excluded from this trial. Patients in corticosteroid therapy who initially responded but recurred with their first taper were not eligible. All patients provided written informed consent, and the study protocol was approved by the local Ethics Committee.

Diagnosis of Steroid-Refractory GVHD and Evaluation of Response

The initial evaluation and grading of aGVHD was primarily based on clinical findings. Diagnosis was supported by skin, liver, or gastrointestinal (GI) tract biopsy results whenever indicated and clinically possible. Patients had received initial treatment for GVHD with corticosteroids given at a dose equivalent to 2 mg/kg of MP. Steroid-refractory GVHD was defined as nonresponse to corticosteroids administered for at least 5 consecutive days or progression after 48 hours of therapy. Twice a week GVHD organ stage scores, overall clinical grade, and relevant differential diagnosis were recorded. Responses were assessed for each involved organ. Complete response (CR) was defined as the complete resolution of GVHD at day 28. Partial response (PR) was defined as improvement in at least 1 organ by at least 1 full stage in the absence of progression in any other organ, allowing for a decrease in the dose or discontinuation of corticosteroids. No response (NR) was defined as no reduction in any GVHD organ staging within 14 days or progression of GVHD. Toxicity was graded according to the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria version 3.0.

Alemtuzumab Treatment and Anti-Infective Prophylaxis

Alemtuzumab was administered subcutaneously at a dose of 10 mg daily for 5 consecutive days. One infant patient who weighed 10 kg received a lower dose, a total of 15 mg divided across 5 consecutive days. All patients received alemtuzumab as second-line therapy. The administration of cyclosporine (CsA) continued during alemtuzumab treatment, and in patients achieving a response, corticosteroids were slowly tapered, by a 25% reduction in dose every week.

All patients received anti-infective prophylaxis at the start of GVHD treatment, including trimethoprim-sulfamethoxazole for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, fluconazole, or itraconazole for fungal infections, and acyclovir for herpes virus reactivation. Cytomegalovirus (CMV) infection was monitored weekly by CMV pp65 antigenemia testing; if the test result became positive, patients were treated preemptively with valganciclovir.

Statistical Analysis

Patients responsive and unresponsive to alemtuzumab treatment were compared on the basis of their clinical characteristics. Categorical variables were compared using Fisher's exact test, and continuous values were compared using the Student's *t*-test. Survival analysis was estimated according to the Kaplan-Meier method.

RESULTS

Patient Characteristics

All HSCT procedures were performed at the Hospital Universitario in Monterrey and Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla. Eighteen patients were eligible for this trial between November 2004 and February 2007, all of whom were evaluable for efficacy and safety. Baseline patient characteristics are summarized in Table 1. The main organ involved was the liver in 4 patients, GI tract in 5, skin in 3, skin and liver in 3, and skin and GI tract in 3. The median age of the patients was 37 years (range: 1-59), and 10 patients (56%) had grade III or IV aGVHD. No prior therapy other than corticosteroids and CsA was used. The median time to onset of aGVHD was 45 days (range: 14-180), with 8 patients developing late-onset aGVHD (after day 100) as defined by the recent NIH Working Group report [32]. Myeloablative conditioning regimen was used in 1 patient and a fludarabine-based reduced-intensity conditioning regimen was used in 17 patients [33-35]. Seventeen patients had received peripheral blood stem cells (PBSCs) obtained from HLA-identical siblings, and 17 patients received GVHD prophylaxis with CsA 3-5 mg/kg in combination with a short course of methotrexate (MTX) on days 1, 3, and 5 or 6 following HSCT. One patient received unrelated cord blood cells, 5/6

Table 1. Baseline Clinical Characteristics

Characteristics	No. of patients (%)
Age, years	
Median	37
Range	1-59
Sex	
Female	11 (61)
Male	7 (39)
Diagnosis	
Acute myelogenous leukemia (AML)	5 (28)
Acute lymphocytic leukemia (ALL)	2 (11)
Chronic myelogenous leukemia (CML)	5 (28)
Multiple myeloma (MM)	2 (11)
Chronic lymphocytic leukemia (CLL)	1 (5.5)
Non-Hodgkin lymphoma (NHL)	1 (5.5)
Myelodysplastic syndrome (MDS)	1 (5.5)
Langerhans' cell histiocytosis (LCH)	1 (5.5)
Donor	
HLA-identical sibling	17 (94)
Unrelated cord blood	1 (6)
Conditioning regimen	
Reduced intensity (RIC)	17 (94)
Myeloablative	1 (6)
Source of stem cell	
Peripheral blood	17 (94)
Cord blood	1 (6)
GVHD prophylaxis	
CsA + methotrexate	17 (94)
CsA + prednisone	1 (6)
GVHD grade	
II	8 (44)
III	8 (44)
IV	2 (11)
Main organ involved	
Liver	4
GI tract	5
Skin	3
Skin and liver	3
Skin and GI tract	3

CsA indicates cyclosporine; GVHD, graft-versus-host disease; GI, gastrointestinal.

HLA compatible, and this patient received GVHD prophylaxis with CsA without MTX. No donor lymphocyte infusion (DLI) was used in any patient.

Response

Fifteen of the 18 patients (83%) responded to alemtuzumab. Six patients (33%) achieved CR, and 9 patients (50%) achieved PR. Five of the 6 patients with CR maintained CR without additional therapy with a median duration of 8 months, and 1 developed disease flare after steroid withdrawal after being in CR for 2 months; this patient was treated with a second course of alemtuzumab and PR was observed. Among 4 of the 6 patients who achieved CR, the main organ involved was the GI tract. Responses by grade of GVHD at study entry and stage of organ involvement are listed in Table 2. Patients with CR or PR were able to decrease the steroid dose by 60% at 28 days of treatment. Two of the 9 patients who achieved PR received

additional therapy with anti-CD20 antibody and thalidomide. At the time of last follow-up, 8 of the 15 responders were receiving a median steroid dose of 20 mg on alternate days. Alemtuzumab treatment failed in 3 patients; in 2 of these cases, the primary organs involved were the bowel and skin, and in the remaining patient, the primary organ affected was the liver. In this group of nonresponding patients, steroid therapy was continued at the standard 2 mg/kg/day dose. Results from the univariate analyses of clinical characteristics between responders and nonresponders showed no differences in the main organ involved, GVHD grade, and time between HSCT and GVHD onset.

Survival

Ten of the 18 patients are still alive at a median follow-up of 11 months (range: 3-24) after alemtuzumab treatment. Survival curves after treatment with alemtuzumab are shown in Figure 1. Actual median survival for the patients with PR and NR are 8 and 2 months, respectively. The 3 patients not responding to alemtuzumab died of GVHD at 25, 40, and 90 days after initiation of therapy. The 5 other deaths were attributed to disease relapse, bronchiolitis obliterans, and infectious complications. Among the 6 patients achieving CR, 1 patient relapsed of underlying disease 9 months after alemtuzumab therapy and is receiving salvage therapy. Extensive chronic GVHD (cGVGD) has occurred in 4 of the 10 surviving patients, and 1 other patient has developed limited cGVHD. Five patients showed no signs of cGVHD.

Safety

After a median follow-up of 9 months (range: 2-23) 14 patients (78%) had 1 or more infectious episodes; 2 patients developed septicemia followed by multiorgan system failure and died 60 and 90 days after initiation of alemtuzumab treatment. One patient had fatal pneumonia of bacterial origin, which developed 6 months after alemtuzumab therapy, and 2 additional patients developed bacterial pneumonia requiring hospital admission but responded to antibiotic treatment. These 3 patients previously received valganciclovir because of asymptomatic CMV reactivation, all resolved before pneumonia developed. Pulmonary tuberculosis was identified early in 1 patient and was successfully treated with broad-spectrum antibiotics. Asymptomatic CMV reactivation occurred in 11 patients documented by positive antigenemia requiring preemptive ambulatory valganciclovir therapy. No invasive fungal infections were observed.

Adverse events such as chills, low-grade fever, and headache were observed in 5 patients. Grade 3 neutropenia occurred in 6 patients, and grade 3 thrombocytopenia in 4 patients. No lymphoproliferative disorders have been observed in this group of patients.

Table 2. GVHD Stage, Response, and Current Status

Patient Age/Sex	Diagnosis	GVHD Stage (Skin-Liver-Gut)	Alemtuzumab Start (Day Post-SCT)	GVHD Grade	Response, Day 28	Current Status (Day Post-Alemtuzumab*)
27/F	AML	1-0-1	23	II	PR	D, sepsis (60)
25/M	ALL	2-0-1	49	II	PR	D, sepsis (90)
27/F	CML	1-0-1	26	II	NR	D, GVHD (25)
53/F	CML	3-0-0	115	II	PR	cGVHD (698)
55/F	CML	3-0-0	110	II	PR	cGVHD(515)
33/M	NHL	2-0-4	42	III	NR	D, GVHD (40)
57/M	CML	2-2-1	128	III	PR	D, relapse (547)
18/M	AML	2-3-0	43	III	PR	D, infection (210)
15/M	AML	1-1-0	158	II	PR	D, cGVHD (450)
59/F	MM	0-1-4	105	IV	CR	No GVHD (560)
53/M	MDS	2-4-0	183	IV	NR	D,GVHD (90)
1/F	LCH	2-1-3	19	III	CR	No GVHD (420)
53/F	AML	3-0-0	185	II	CR	cGVHD (300)
16/F	ALL	2-3-0	108	III	CR	No GVHD (180)
57/F	CLL	0-0-3	40	III	CR	No GVHD (180)
21/F	AML	3-1-0	45	III	PR	cGVHD (65)
43/F	MM	1-0-4	22	III	CR	No,GVHD (90)
38/F	CML	3-1-0	43	II	PR	cGVHD (65)

AML indicates acute myelogenous leukemia; ALL, acute lymphocytic leukemia; CML, chronic myelogenous leukemia; MM, multiple myeloma; MDS, myelodysplastic syndrome; LCH, Langerhans' cell histiocytosis; PR, partial response; CR, complete response; NR, no response; D, dead; GVHD, graft-versus-host disease; cGVHD, chronic GVHD.
*Day after alemtuzumab.

Lymphocyte counts dropped during the first week after alemtuzumab treatment and remained low (<500 cells/ μ L) for the subsequent 2 to 8 weeks (mean duration of 6 weeks).

DISCUSSION

The treatment of steroid-refractory GVHD remains a therapeutic challenge. Results from recent studies for salvage therapy after steroid failure are summarized in Table 3 [9,11-13,36-42]. Treatment with alemtuzumab therapy induces an overall response rate of 83% and a CR rate of 33%, which is favorable

or comparable to other agents currently under investigation. Bordigoni et al. [36] recently found a response rate of 90% after daclizumab administration, which was higher than 83% demonstrated in our trial; of note, few patient suffered from severe grades III-IV

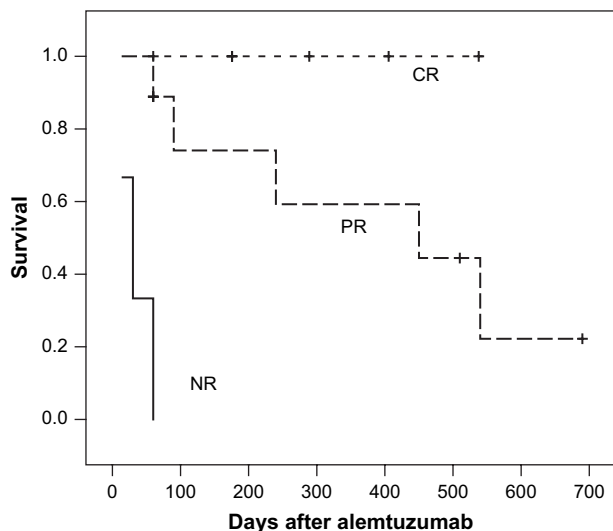


Figure 1. Kaplan-Meier plot of overall survival based on response to alemtuzumab therapy.

Table 3. Summary of Studies for Steroid-Refractory GVHD

Agent	N	Overall Response or Improvement	Study
Antithymocyte globulin	79	54%	MacMillan et al., 2002 [11]
ABX-CBL (anti-CD147)	47	57%	MacMillan et al., 2007 [41]
Mycophenolate mofetil	48	56%	MacMillan et al., 2007 [41]
Pentostatin	10	60%	Krejci et al., 2005 [40]
Etanercept	23	74%	Bolanos-Meade et al., 2005 [9]
Denileukin diftitox	13	46%	Busca et al., 2007 [37]
Basiliximab (anti-IL-2 receptor)	30	71%	Ho et al, 2004 [39]
Daclizumab (anti-CD25)	23	83%	Schmidt-Hieber et al., 2005 [42]
Infliximab (anti-TNF- α)	43	51%	Przepiorka et al, 2000 [13]
Visilizumab (anti-CD3)	62	90%	Bordigoni et al., 2006 [36]
	32	59%	Patriarca et al, 2004 [12]
	44	32%	Carpenter et al., 2005 [38]

TNF- α indicates tumor necrosis factor- α ; GVHD, graft-versus-host disease.

aGVHD at the beginning of daclizumab therapy, and 56% of them had steroid-dependent aGVHD.

In our study, notably, treatment with alemtuzumab resulted in the tapering of steroid therapy in the majority of responding patients, by at least 60% of the initial steroid dose after 28 days from treatment initiation. Furthermore, our study is 1 of the first to examine salvage therapy of late-onset (>100 days) aGVHD. In the present study, 8 patients developed acute manifestations of GVHD beyond day 100 from HSCT, 6 of whom achieved PR. Recently the NHI Consensus Conference recognized a late aGVHD (after day 100); we included this group of patients with a clinical picture of aGVHD who should be treated with a shorter treatment interval of more intensive immunosuppression to control acute inflammatory manifestations. Although results from the univariate analysis suggest that none of the clinical characteristics examined were predictive of response to alemtuzumab therapy, the number of patients in this study was small. Hence, these results will require further investigation in a larger clinical trial. In our centers the use of matched unrelated HSCT is done using only cord blood cells, and occasionally we use mismatched HSCT; therefore, only 1 patient who received unrelated cord blood cells was included.

As expected, infections were a common complication of alemtuzumab therapy, emphasizing the need to adhere to anti-infective prophylaxis and close monitoring for infections. With a median follow-up of 9 months (range: 2-23), 3 patients developed infectious complications and died, all of whom had PR and remained dependent on corticosteroid therapy. CMV reactivation was common, and most incidences developed shortly after lymphocyte nadir, which occurred between weeks 2 and 4 after initiation of alemtuzumab. All patients with CMV reactivation were successfully treated with valganciclovir; importantly, no progression to CMV disease was observed.

Treatment with alemtuzumab was well tolerated, with only 5 patients developing headache, low-grade fever, and/or chills after the first dose. None of the patients developed injection-site skin reactions. Transient cytopenia occurred in 6 patients; thrombocytopenia was most common after 2 weeks, and neutropenia after 3 weeks of alemtuzumab therapy. No patient required blood component transfusions or growth factor support. In the majority of patients, cytopenias resolved within 6 weeks of onset. Lymphopenia, which is attributable to the direct consequence of the pharmacologic action of alemtuzumab, was the most common hematologic toxicity. Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoproliferative disorders were not observed in this study. Although therapeutic agents that may affect T cell function after allogeneic HSCT raise concerns for engraftment and control of disease, none of the patients in our study developed graft rejection; in the 2

patients with relapse of underlying disease, 1 had ongoing GVHD and the other maintains complete chimerism without signs of GVHD.

The results of this study suggest that subcutaneous alemtuzumab can be safely administered in patients with steroid-refractory aGVHD, and that it is associated with a promising response rate. Further studies are warranted to confirm our findings in a larger patient population and also in the setting of unrelated HSCT, in order to determine the optimal dose and duration of treatment and to explore the possibility of a maintenance schedule.

REFERENCES

1. Ferrara JL, Reddy P. Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Semin Hematol.* 2006;43:3-10.
2. Martin PJ, Schoch G, Fisher L, et al. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood.* 1990;76:1464-1472.
3. Nash RA, Antin JH, Karanes C, 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.* 2000;96:2062-2068.
4. Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorcka D, 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.* 1998;92:2303-2314.
5. Deeg HJ. How I treat refractory acute GVHD. *Blood.* 2007;109:4119-4126.
6. Van Lint MT, Milone G, Leotta S, et al. Treatment of acute graft-versus-host disease with prednisolone: significant survival advantage for day +5 responders and no advantage for nonresponders receiving anti-thymocyte globulin. *Blood.* 2006;107:4177-4181.
7. Antin JH, Chen AR, Couriel DR, Ho VT, Nash RA, Weisdorf D. Novel approaches to the therapy of steroid-resistant acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004;10:655-668.
8. Basara N, Blau WI, Romer E, et al. Mycophenolate mofetil for the treatment of acute and chronic GVHD in bone marrow transplant patients. *Bone Marrow Transplant.* 1998;22:61-65.
9. Bolanos-Meade J, Jacobsohn DA, Margolis J, et al. Pentostatin in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *J Clin Oncol.* 2005;23:2661-2668.
10. Bruner RJ, Farag SS. Monoclonal antibodies for the prevention and treatment of graft-versus-host disease. *Semin Oncol.* 2003;30:509-519.
11. MacMillan ML, Weisdorf DJ, Davies SM, et al. Early antithymocyte globulin therapy improves survival in patients with steroid-resistant acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8:40-46.
12. Patriarca F, Sperotto A, Damiani D, et al. Infliximab treatment for steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Haematologica.* 2004;89:1352-1359.
13. Przepiorcka D, Kernan NA, Ippoliti C, et al. Daclizumab, a humanized anti-interleukin-2 receptor alpha chain antibody, for treatment of acute graft-versus-host disease. *Blood.* 2000;95:83-89.

14. Van Lint MT, Uderzo C, Locasciulli A, 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*. 1998;92:2288-2293.
15. Campath (alemtuzumab) prescribing information. Available at: http://berlexbayerhealthcare.com/html/products/pi/Campath_PI.pdf (accessed 2007).
16. Buggins AG, Mufti GJ, Salisbury J, et al. Peripheral blood but not tissue dendritic cells express CD52 and are depleted by treatment with alemtuzumab. *Blood*. 2002;100:1715-1720.
17. Ginaldi L, De MM, Matutes E, et al. Levels of expression of CD52 in normal and leukemic B and T cells: correlation with in vivo therapeutic responses to Campath-1H. *Leuk Res*. 1998;22:185-191.
18. Hale G. The CD52 antigen and development of the CAMPATH antibodies. *Cytotherapy*. 2001;3:137-143.
19. Ratzinger G, Reagan JL, Heller G, Busam KJ, Young JW. Differential CD52 expression by distinct myeloid dendritic cell subsets: implications for alemtuzumab activity at the level of antigen presentation in allogeneic graft-host interactions in transplantation. *Blood*. 2003;101:1422-1429.
20. Ravandi F, O'Brien S. Alemtuzumab. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2005;5:39-51.
21. Hale G, Bright S, Chumbley G, et al. Removal of T cells from bone marrow for transplantation: a monoclonal antilymphocyte antibody that fixes human complement. *Blood*. 1983;62:873-882.
22. Keating MJ, Flinn I, Jain V, et al. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood*. 2002;99:3554-3561.
23. Delgado J, Thomson K, Russell N, et al. Results of alemtuzumab-based reduced-intensity allogeneic transplantation for chronic lymphocytic leukemia: a British Society of Blood and Marrow Transplantation Study. *Blood*. 2006;107:1724-1730.
24. Khouri IF, Albitar M, Saliba RM, et al. Low-dose alemtuzumab (Campath) in myeloablative allogeneic stem cell transplantation for CD52-positive malignancies: decreased incidence of acute graft-versus-host-disease with unique pharmacokinetics. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33:833-837.
25. Kottaridis PD, Milligan DW, Chopra R, et al. In vivo CAMPATH-1H prevents graft-versus-host disease following non-myeloablative stem cell transplantation. *Blood*. 2000;96:2419-2425.
26. Morris E, Mackinnon S. Outcome following alemtuzumab (CAMPATH-1H)-containing reduced intensity allogeneic transplant regimen for relapsed and refractory non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *Transfus Apher Sci*. 2005;32:73-83.
27. Perez-Simon JA, Kottaridis PD, Martino R, et al. Nonmyeloablative transplantation with or without alemtuzumab: comparison between 2 prospective studies in patients with lymphoproliferative disorders. *Blood*. 2002;100:3121-3127.
28. Busca A, Locatelli F, Lovisone E, et al. Treatment of severe refractory acute graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract with Campath-1H. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11:734-736.
29. Carella AM, Beltrami G, Scalzulli PR, Carella AM Jr., Corsetti MT. Alemtuzumab can successfully treat steroid-refractory acute graft-versus-host disease (aGVHD). *Bone Marrow Transplant*. 2004;33:131-132.
30. Wandroo F, Auguston B, Cook M, Craddock C, Mahendra P. Successful use of Campath-1H in the treatment of steroid refractory liver GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2004;34:285-287.
31. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, et al. 1994 Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant*. 1995;15:825-828.
32. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11:945-956.
33. Gomez-Almaguer D, Ruiz-Arguelles GJ, Tarin-Arzaga LC, et al. Reduced-intensity stem cell transplantation in children and adolescents: the Mexican experience. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003;9:157-161.
34. Ruiz-Arguelles GJ, Gomez-Almaguer D, Ruiz-Arguelles A, Gonzalez-Llano O, Cantu OG, Jaime-Perez JC. Results of an outpatient-based stem cell allotransplant program using non-myeloablative conditioning regimens. *Am J Hematol*. 2001;66:241-244.
35. Ruiz-Arguelles GJ, Gomez-Almaguer D, Morales-Toquero A, et al. The early referral for reduced-intensity stem cell transplantation in patients with Ph1 (+) chronic myelogenous leukemia in chronic phase in the imatinib era: results of the Latin American Cooperative Oncohematology Group (LACOHG) prospective, multicenter study. *Bone Marrow Transplant*. 2005;36:1043-1047.
36. Bordigoni P, Dimicoli S, Clement L, et al. Daclizumab, an efficient treatment for steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2006;135:382-385.
37. Busca A, Locatelli F, Marmont F, Ceretto C, Falda M. Recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor fusion protein as treatment for steroid refractory graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol*. 2007;82:45-52.
38. Carpenter PA, Lowder J, Johnston L, et al. A phase II multicenter study of visilizumab, humanized anti-CD3 antibody, to treat steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11:465-471.
39. Ho VT, Zahrieh D, Hochberg E, et al. Safety and efficacy of denileukin diftitox in patients with steroid-refractory acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2004;104:1224-1226.
40. Krejci M, Doubek M, Buchler T, Brychtova Y, Vorlicek J, Mayer J. Mycophenolate mofetil for the treatment of acute and chronic steroid-refractory graft-versus-host disease. *Ann Hematol*. 2005;84:681-685.
41. MacMillan ML, Couriel D, Weisdorf DJ, et al. A phase 2/3 multicenter randomized clinical trial of ABX-CBL versus ATG as secondary therapy for steroid-resistant acute graft-versus-host disease. *Blood*. 2007;109:2657-2662.
42. Schmidt-Hieber M, Fietz T, Knauf W, et al. Efficacy of the interleukin-2 receptor antagonist basiliximab in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2005;130:568-574.

PUBLICACIÓN 6 - TRADUCCIÓN

Alemtuzumab para el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped refractaria a esteroides.

Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles GJ, del Carmen Tarín-Arzaga L, González-Llano O, Gutiérrez-Aguirre H, Cantú-Rodríguez O, Jaime-Pérez J, Carrasco-Yalán A, Giralt S.

Biology of Blood and Marrow Transplantation 2008;14:10-15.

Resumen

El tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped aguda (EICHa) resistente a esteroides sigue siendo un reto clínico para el cual no existe un tratamiento estándar. El alemtuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD52, utilizado con éxito como parte del régimen de acondicionamiento en los trasplantes de células hematopoyéticas (TCH) para prevenir la EICH. El propósito de este estudio fue evaluar la seguridad y eficacia del alemtuzumab en el tratamiento de la EICHa refractaria a esteroides (grado II-IV) después de un TCH. Dieciocho pacientes recibieron por vía subcutánea 10mg/día durante cinco días consecutivos de alemtuzumab. La respuesta se evaluó 28 días después de haber iniciado el uso de alemtuzumab. Ocho pacientes tuvieron EICHa grado II, ocho tuvieron grado III y dos grado IV. En 4 pacientes el principal órgano afectado fue el hígado, el tracto gastrointestinal (TG) en cinco, la piel en tres, piel e hígado en otros tres, y piel y TG en los otros tres. Quince pacientes (83%) respondieron al alemtuzumab, incluyendo 6 (33%) que tuvieron respuesta completa. Los tres pacientes que no respondieron fallecieron por EICH. Diez de los quince pacientes que respondieron siguen vivos con una mediana de seguimiento de 11 meses (rango 3-24). Ocurrieron infecciones en 14 pacientes, incluyendo reactivación por citomegalovirus en once de ellos. Neutropenia y trombocitopenia grado 3 se presentaron en 6 y 4 pacientes, respectivamente. El alemtuzumab fue bien tolerado e indujo tasas de respuesta promisorias en la EICHa refractaria a esteroides.

Introducción

La enfermedad injerto contra huésped (EICH) es causa de altas tasas de morbilidad y mortalidad en el trasplante alogénico de células hematopoyéticas (TCH), su incidencia es muy variable y depende de muchos factores [1-2], los corticoesteroides continúan siendo el

tratamiento de primera elección y pueden observarse respuestas favorables hasta en el 50 % de los enfermos [3-5].

Se han evaluado múltiples opciones terapéuticas para los casos en los que la enfermedad no ha respondido al manejo inicial de corticoesteroides, por ejemplo, ciclosporina A, globulina anti-timocito, micofenolato de mofetilo, tacrolimus, etanercept y diferentes anticuerpos monoclonales, entre otras [6-14].

El alemtuzumab (Campath-1H) es un anticuerpo monoclonal humanizado no conjugado IgG 1 kappa dirigido contra el antígeno CD52 expresado en linfocitos T, linfocitos B, monocitos, células dendríticas derivadas de monocitos, macrófagos y eosinófilos [15-20].

Reportes más recientes sugieren que puede utilizarse alemtuzumab en los regímenes de acondicionamiento de los TCH alogénicos para disminuir la severidad de la EICH [23- 27]. Informes de casos aislados indican que el alemtuzumab ha sido útil en el tratamiento de la EICH aguda y grave refractaria a corticoesteroides [28- 30].

Pacientes y Métodos

Criterios de inclusión. Se decidió iniciar un estudio prospectivo para evaluar la seguridad y la eficiencia del alemtuzumab en un grupo de 18 pacientes con EICHa refractaria a esteroides. Fueron incluidos pacientes que habían sido sometidos a un TCH alogénico de donante emparentado, o aquellos en quienes las CH habían sido obtenidas de una unidad de sangre de cordón umbilical de donantes no emparentados y que presentaban una EICH grado II-IV refractaria al tratamiento con esteroides de acuerdo a los criterios del Consenso Internacional [31].

Diagnóstico de la enfermedad injerto contra huésped refractaria al uso de esteroides y evaluación de la respuesta. El diagnóstico y la clasificación de la EICH se basó en los hallazgos clínicos, cuando se consideró necesario y fue posible se obtuvo tejido para análisis por anatomía patológica. Se consideró enfermedad refractaria cuando después del tratamiento con metilprednisolona a 2mg/Kg/día se encontró progresión después de 48 horas o no mejoría después de 5 días de haber iniciado el tratamiento. Se llevó a cabo una clasificación

clínica de la EICH dos veces por semana y las respuestas fueron evaluadas para cada órgano involucrado. Se consideró respuesta completa cuando había resolución completa de la EICH al día 28 después del inicio del tratamiento; respuesta parcial cuando se evidenció mejoría de la sintomatología en, al menos, un órgano involucrado sin que ocurriera progresión en cualquier otro órgano; y se definió como ausencia de respuesta cuando no se presentó ningún dato de mejoría en cualquiera de los órganos afectados después de 14 días de tratamiento, o cuando ocurrió progresión de la enfermedad en este mismo período de tiempo. La clasificación de la toxicidad se basó en los Criterios de toxicidad del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América, versión 3.0.

Tratamiento con Alemtuzumab y profilaxis antiinfecciosa. El alemtuzumab fue en los 18 pacientes la segunda línea de tratamiento para la EICHa y se administró por vía subcutánea a una dosis de 10mg/día durante cinco días consecutivos. Un paciente pediátrico de 10 Kg de peso recibió 3mg/día durante cinco días consecutivos. Durante el tratamiento todos los pacientes continuaron recibiendo ciclosporina A, y cuando se observó una respuesta positiva al alemtuzumab se inició una disminución de la dosis de corticoesteroides, a razón del 25% de la dosis cada semana.

Análisis estadístico. Las variables categóricas fueron comparadas utilizando la prueba exacta de Fisher y las variables continuas utilizando la prueba *t* de Student, el análisis de la supervivencia se llevó a cabo de acuerdo al método de Kaplan-Meier.

Resultados

Características de los pacientes. Los pacientes del estudio fueron trasplantados en México, en el Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González de la Facultad de Medicina de la UANL en Monterrey o en el Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla. Los procedimientos se llevaron a cabo entre los años 2004 y 2007.

En cuatro pacientes la mayor afectación fue hepática, tubo gastrointestinal en cinco, piel en tres, la combinación de piel e hígado ocurrió en tres enfermos, y piel y tubo digestivo en otros tres. La mediana de edad fue de 37 años con un rango entre 1 y 59; el 56 % de los pacientes presentaron EICH aguda grado III o IV. La mediana de tiempo de inicio de la EICHa

fue de 45 días con un rango de 14 a 180 días. Ocho pacientes manifestaron un inicio tardío de la EICH, es decir que ocurrió después de 100 días de haber realizado el TCH según el reporte de toxicidad común del NIH [32].

En 17 de los 18 pacientes el régimen de acondicionamiento utilizado fue de intensidad reducida, solo un paciente recibió un acondicionamiento mieloablativo [33-35]. Diecisiete pacientes recibieron CH de sangre periférica del donante, que en los 17 casos fue un hermano HLA idéntico. La prevención para EICH fue a base de ciclosporina A y un curso corto de metotrexato que se administró en tres dosis, los días +1,+3 y +6 del TCH.

Respuesta. Se obtuvieron nueve respuestas parciales (50%) y seis respuestas completas (33%). Del grupo de pacientes con respuesta completa, cinco pacientes de los seis mantuvieron esta respuesta completa sin medidas adicionales durante una mediana de 8 meses, un enfermo requirió un segundo curso de alemtuzumab con el que se obtuvo una respuesta parcial. Cuatro de los seis pacientes con respuesta completa habían manifestado EICH con involucro principal de tubo digestivo.

En los quince pacientes con respuestas completas o parciales (83%), fue posible disminuir la dosis del esteroide hasta un 60% a los 28 días de haber iniciado el tratamiento. En el momento de la última consulta de seguimiento del grupo, 8 de los 15 pacientes que respondieron estaban recibiendo una mediana de dosis de esteroide de 20mg/día en días alternos. No se obtuvo ninguna respuesta con alemtuzumab en tres pacientes. En el análisis estadístico no se observaron diferencias significativas en cuanto al principal órgano involucrado, en el grado de EICH ni en el tiempo transcurrido entre el TCH y la aparición de la EICH.

Supervivencia. Diez de los 18 pacientes del grupo estaban vivos después del tratamiento con Alemtuzumab con una mediana de seguimiento de 11 meses; la mediana de supervivencia de los pacientes con respuesta parcial fue de 8 meses, y de dos meses para los que no respondieron; de hecho, los tres pacientes que no respondieron murieron de EICH 25, 40 y 90 días después de que recibieron el tratamiento.

Cuatro de los seis pacientes que presentaron respuesta completa, y uno de los pacientes que presentó respuesta parcial, en el momento de la última consulta de seguimiento no presentaban datos de EICH.

Seguridad. Con una mediana de seguimiento de nueve meses, 14 de los 18 pacientes (78%) desarrollaron al menos un proceso infeccioso, dos pacientes fallecieron por septicemia y fallo orgánico múltiple dentro de los primeros tres meses posteriores al tratamiento. Otro paciente falleció de una neumonía bacteriana seis meses después del tratamiento, y dos más presentaron también procesos neumónicos que respondieron al tratamiento antibiótico.

Se observó un caso de tuberculosis pulmonar y no se documentaron infecciones micóticas; por otro lado, se observó reactivación de citomegalovirus en once pacientes por resultar positiva la prueba de antigenemia, todos requirieron de valganciclovir. Efectos menores como fiebre, escalofríos y cefalea ocurrieron en cinco pacientes, neutropenia grado 3 ocurrió en seis pacientes, y trombocitopenia grado 3 en cuatro enfermos. La disminución en la cuenta de linfocitos ocurrió tempranamente dentro de la primera semana del tratamiento y cifras de linfocitos $<500/\mu\text{L}$ se observaron a unas seis semanas de mediana.

Discusión

El tratamiento de la EICHa constituye un reto muy importante en los TCH, los resultados obtenidos en este pequeño grupo de pacientes permiten sugerir que el alemtuzumab puede ser considerado como una opción más para el manejo de este problema [9,11-13,36-42].

Se observaron reacciones leves relacionadas con la administración del medicamento, así como citopenias diversas, especialmente linfopenia. Ningún paciente requirió transfusiones ni la utilización de factor estimulante de colonias granulocíticas.

Como se esperaba, los procesos infecciosos fueron los eventos más comunes como complicación del uso del alemtuzumab; es necesario insistir en lo importante de llevar a cabo un programa efectivo de prevención de infecciones, la reactivación por el virus

citomegálico ocurrió en once pacientes, el tratamiento con valganciclovir permitió la resolución de todos los casos.

Podemos concluir, con los favorables resultados obtenidos en nuestro grupo de pacientes, que el alemtuzumab administrado por vía subcutánea puede ser considerado como otra opción en el tratamiento de la EICHa refractaria a esteroides.

ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION USING A REDUCED-INTENSITY CONDITIONING REGIMEN IN INFANTS: Experience at a Single Institution in Mexico

Oscar Gonzalez Llano, José Carlos Jaime Perez, Olga Cantu Rodriguez, Consuelo Mancias Guerra, Homero Gutiérrez Aguirre, Jose Luis Herrera Garza, Laura Rodriguez-Romo, and David Gomez Almaguer □ *Pediatric Department and Hematology Service, School of Medicine and University Hospital, “Dr. Jose E. Gonzalez,” Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey, Mexico*

□ *The authors report their experience with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in infants at a university hospital in México. Five infants had one of each of the following diagnoses: acute lymphoblastic leukemia, osteopetrosis for which the patient underwent 2 procedures, acute disseminated multiorgan Langerhans cell histiocytosis, and two cases of hemophagocytic lymphohistiocytosis. The source of stem cells for grafting in 2 children was peripheral blood, and in 3 children was unrelated cord blood. A reduced-intensity conditioning regimen including fludarabine, cyclophosphamide, and melphalan was administered. Three patients are disease-free transplant survivors without graft-versus-host disease after 46, 34, and 16 months.*

Keywords allogeneic stem cell transplantation, infants, reduced-intensity conditioning regimen

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is an important therapeutic option that can be curative for pediatric patients with hematological and nonhematological diseases, congenital or acquired, including malignancies, immunodeficiencies, and storage diseases [1–3]. Despite important advances in stem cell (SC) sources and conditioning programs, patients in developing countries who require HSCT are unable to receive one due to lack of a compatible HLA donor [4] or to the economic burden that this procedure represents [5, 6]. The special challenge of caring for infants can represent an additional obstacle for performing HSCT.

Received 23 February 2007; accepted 28 September 2007.

This article is not subject to United States Copyright laws.

Address correspondence to Dr. Oscar González Llano, Hospital Universitario, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ave. Madero y Gonzalitos Colonia Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León, C.P. 64460, México. E-mail: ogzzll25@hotmail.com

We present our experience with 6 allogeneic HSCT carried out in 5 patients with hematological diseases, all younger than 18 months of age at the time of the transplant, at a public institution in Mexico.

PATIENTS AND METHODS

Patients

The clinical files of patients younger than 18 months of age who had an allogeneic HSCT performed since 2003 at the “Dr. José E. Gonzalez” University Hospital of the School of Medicine of the Autonomous University of Nuevo Leon, in Monterrey, Mexico, were reviewed retrospectively. Information was obtained from 5 infants, 1 male and 4 females, between 7 and 14 months of age at the time of the transplant. There were 2 patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH), and 1 with each of the following diseases: acute lymphoblastic leukemia (ALL), acute disseminated multiorgan Langerhans cell histiocytosis (LCH), and osteopetrosis (OP); in this last case, 2 procedures were performed. Patient characteristics are summarized in Table 1. In all cases, before transplantation was carried out, authorization was obtained from the Ethics Committee of the Hospital and informed consent from the patient’s parents.

HLA Typing

High-resolution HLA compatibility was complete in 2 of the 6 procedures. For the child with ALL, the donor was his 22-month-old brother; in the other patient, a boy with HLH, the donor was his 26-year-old HLA-identical father. In these 2 cases, SC were obtained from peripheral blood (PB) after mobilization with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), administered subcutaneously at a dose of 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ for 5 days. Four of our procedures were performed obtaining the SC from cord blood units abroad (3 from The New York Blood Center, NY, and 1 from Stemcyte, Arcadia, CA), with compatibility in 4/6 HLA antigens in 3 cases and 5/6 in the other.

Conditioning Regimen

The reduced intensity conditioning (RIC) regimen included fludarabine (30 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{day}$ for 3 days), cyclophosphamide (350 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{day}$ for 3 days), and melphalan (70 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{day}$ for 2 days); anti-lymphocyte globulin was administered to the girl with OP before her second cord blood transplant with the intent of increasing her chances for successful grafting.

TABLE 1 Pertinent Transplant Information of Five Infants with Hematological Diseases

	Age at the time of transplant	Source of stem cells	GvHD prophylaxis	Day of engraftment ANC > 500 PLT > 20,000	Number of mononuclear cells/kg	Number of CD34 cells/kg	Conditioning regimen	HLA	GvHD	Status
Case 1 ALL	7 months	Peripheral blood	Cyclosporine and methotrexate	+17 +20	7.25×10^8	5.59×10^6	Cyclophosphamide Fludarabine	6/6	No	Alive 46 months
Case 2/ Procedure 1 OP	9 months	Umbilical cord blood	Cyclosporine and methotrexate	—	2.43×10^7	1.63×10^5	Cyclophosphamide Fludarabine Melfalan	4/6	No	
Case 2/ Procedure 2 OP	13 months	Umbilical cord blood	Cyclosporine and methylprednisolone	—	2.9×10^7	2.37×10^5	Cyclophosphamide Fludarabine ATGAM Melfalan	4/6	No	Death (disease progression)
Case 3 HLH	11 months	Umbilical cord blood	Cyclosporine and methotrexate	+13 +17	6.8×10^7	3.71×10^5	Cyclophosphamide Fludarabine	4/6	Grade IV Intestine	Death (sepsis)
Case 4 HLH	9 months	Peripheral blood	Cyclosporine and methotrexate	+20 +33	20.2×10^8	9.0×10^6	Cyclophosphamide Fludarabine Melfalan	6/6	Grade I Intestine	Alive 34 months
Case 5 LCH	14 months	Umbilical cord blood	Cyclosporine and methylprednisolone	+36 +38	7.4×10^7	2.40×10^5	Cyclophosphamide Fludarabine Melfalan	5/6	Grade III Intestine	Alive 16 months

Hematopoietic Precursors

The number of CD34⁺ hematopoietic precursors transplanted was measured by flow cytometry (FACScalibur, Beckton Dickinson, San Jose, CA), administering 9.0 and 5.59×10^6 /kg of recipient's body weight in the 2 cases where peripheral hematopoietic progenitors were infused. In the 4 transplants where stem cells were obtained from cord blood units the doses were 1.63, 2.37, 2.40, and 3.71×10^5 /kg of CD34⁺ HSC; the corresponding nucleated cell count/kg was 2.43, 2.9, 7.4, and 6.8×10^7 /kg.

Graft Versus Host Disease (GvHD) Prophylaxis and Supportive Care

In the 2 cases where SC were obtained from peripheral blood and in 2 of the UCB transplants, patient number 3 and the first procedure in the infant with OP, GvHD prophylaxis included cyclosporin A (CsA) at 5 mg/kg/day, initiated the day before the infusion of SC, and methotrexate (MTX) at 5 mg/m²/day on days +1, +3, and +6 [7].

In the remaining 2 cases receiving a umbilical cord blood (UCB) transplant, CsA at the same doses and methylprednisolone at 1 mg/kg/day (0 to +4) and 2 mg/kg/day (+5 to +15), respectively, were administrated [8]. GvHD staging and grading are shown in Table 1.

All patients received standard doses of prophylactic antibiotics, antimycotics, and antivirals, in addition to administration of systemic antibiotics for the appearance of infectious complications. All blood products transfused were irradiated and leukodepleted.

RESULTS

Table 1 displays important data and current status in our group of 5 infants.

Hematological Recovery

Hematological recovery, defined by the presence of a total number of neutrophils $>0.5 \times 10^9$ /L and a platelet count $>20 \times 10^9$ /L, was achieved in 4/6 transplants on days 13, 17, 20, and 38 for neutrophils, and on days 17, 20, 33, and 38 for platelets after the infusion of the SC. Such recovery did not occur in either of the two transplants carried out on the patient with OP.

Engraftment

Engraftment was documented by chimerism studies. It was complete in 3 of 5 patients, in 1 case (case 1) it was determined by FISH analysis for sex

chromosomes, and in 2 cases (cases 4 and 5) through STR (short tandem repeats) studies. Chimerism was not detected in either of the 2 transplants carried out on our female patient with OP, nor was it determined in the patient with HLH and acute severe GvHD.

GvHD

Three patients, numbers 3, 4, and 5 in Table 1, developed acute GvHD; one (number 4), presented with grade I intestinal involvement. In this case complete control was obtained after the administration of prednisolone, 2 mg/kg/day for 7 days. Patient 5, a female with LCH, presented with grade III intestinal involvement without response to corticosteroids. Alemtuzumab (Campath-1H), 3 mg/day for 5 days was administered, obtaining an excellent response. Patient 3, a female with HLH and grade IV intestinal involvement, was treated with corticosteroids, CsA, anti-tumor necrosis factor antibodies, mofetil mycophenolate, and anti-thymocyte globulin, without improvement. The patient died of sepsis 65 days after her transplant.

Additional Complications

Due to the appearance of acute neurological toxicity in the patient with LCH, manifested by seizures, hemiparesis, and alterations on the state of consciousness, in the presence of an abnormal electroencephalogram and normal cerebrospinal fluid findings, CsA toxicity was suspected and the drug suspended. Mofetil mycophenolate was initiated on day +19.

Current Status

Currently, 3/5 patients are alive and disease free 46, 34, and 16 months after HSCT. Two patients died, one with HLH (case 3) at day +65 of GvHD complications, and the patient with OP, on day +570 after the second HSCT, due to progression of her disease.

DISCUSSION

The lack of a compatible HLA donor and financial constraints are the most frequent reasons for the small percentage of patients transplanted in developing countries [5]. Considering that the worldwide tendency is to perform more HSCT of different types, it must be a high priority for responsible medical teams to develop strategies that lead to performing the optimum number of transplants [6]. This will translate into higher survival rates and increased quality of life for patients with life-threatening catastrophic childhood diseases.

In this setting, hematopoietic transplantation performed in infants presents special characteristics. There appears to be a greater rate of graft acceptance with less rejection and less GvHD, in part explained by the immaturity of the infant's immune system. In addition, better results have been obtained with transplants from unrelated donors [10, 11]. Improved tolerance to chemotherapy administered according to the child's own pharmacokinetic characteristics has been reported [11]; therefore, contraindications do not exist to perform allogeneic HSCT in infants who meet the criteria for this therapeutic modality.

In this small group only 2 infants had a fully HLA-compatible family donor: the father of case 4, the product of a consanguineous marriage, and the 22-month-old brother in case 1. This last donor was mobilized with subcutaneous G-CSF, despite the controversy regarding its possible secondary effects in healthy individuals. The donor child remains completely healthy 46 months after receiving the recombinant protein, in keeping with recent information establishing the safety of G-CSF administration to healthy donors [12, 13].

Only 1 out of 4 patients who are candidates for an allogeneic HSCT will have an HLA-matched family donor. For the remaining 75% it will be necessary to search for an unrelated compatible donor. For children the first option is to search in an umbilical cord blood bank (UCBB) [14, 15], this was the case in 3 of our patients, who did not have a living unrelated donor available. Taking into account the high cost involved in obtaining cord units outside our country (\$25,000 USD per unit), the establishment of regional public cord blood banks appears essential to sustain viable transplant programs in developing nations [16].

There were two graft failures in our patient suffering from OP, probably related to the disease severity or the advanced disease stage at which the procedures were performed, but alternative explanations exist. For example, an increased total nucleated cell dose/kg has been suggested for engraftment with a 4/6 HLA disparity between the cord blood unit and the recipient [17, 18], or increased immunosuppression may be needed for certain nonmalignant conditions. There is a recent report of successful CB transplant in this disease at an older age [19]. Stem cell loading could have been an issue in our OP patient, who received the lower dose in her two transplants, but the infused dose was in the recommended range. In this particular patient, a MTX/CsA GvHD prophylaxis regimen was administered in the first procedure and switched to CsA and methylprednisolone after the second transplant. In case 3, also receiving UCB, a prophylaxis regimen consisting of MTX/CsA also was administered, but severe GvHD developed and the patient died. Only this patient died from GvHD.

In the patient with LCH and neurological alterations, nuclear magnetic resonance demonstrated findings characteristic of those reported in cases of CsA toxicity. Gradual neurological improvement was observed after the

withdrawal of CsA, confirming the reversible nature of this complication [20, 21].

The use of RIC regimens, originally designed for debilitated patients with little tolerance for the administration of high doses of chemotherapy, and usually of advanced age [22, 23], is useful in children, especially because these regimens are associated with lower long-term toxicity than conventional myeloablative conditioning. It is reasonable to assume that the pediatric population would benefit from such an important advantages [24–31]. We did not use total body irradiation (TBI) in our patients as long-term risks appear to outweigh benefits, and because fludarabine as administered in this report is as immunosuppressive as TBI. We have experience performing HSCT after RIC regimens in children, and are convinced of the advantages that they offer, in addition to less long-term toxicity, which is particularly pertinent in this age group. Those advantages included lower transfusion requirements, number of infectious complications and antibiotic use, as well as the possibility of being carried out in an ambulatory setting with significant cost reduction [24, 25].

In conclusion, this report adds to the scarce information on the subject of infant and child HSCT employing RIC regimens, particularly for OP, in which a recent encouraging report suggests its feasibility and benefits [19]. Recently, transplant employing RIC regimen has been suggested for infant ALL transplantation [32]. Despite the small number of patients and relative short follow-up, our results suggest that allogeneic HSCT after a RIC regimen represents a good additional therapeutic option in infants with diverse malignant and nonmalignant but life-threatening diseases.

REFERENCES

- [1] Horwitz ME. Stem cell transplantation for inherited immunodeficiency disorders. *Pediatr Clin North Am.* 2000;47:1371–1387.
- [2] Kojima S, Inaba J, Yoshimi A, et al. Unrelated donor marrow transplantation in children with severe aplastic anemia using cyclophosphamide, anti-thymocyte globulin and total body irradiation. *Br J Hematol.* 2001;114:706–711.
- [3] Balduzzi A, Valsecchi MG, Uderzo C, et al. Chemotherapy versus allogeneic transplantation for very high risk childhood acute lymphoblastic leukemia in first complete remission: comparison by genetic randomization in an international prospective study. *Lancet.* 2005;366:135–141.
- [4] Schipper RF, D’Amaro J, Oudshoorn M. The probability of finding a suitable related donor for bone marrow transplantation in extended families. *Blood.* 1996;15:800–804.
- [5] Gomez-Almaguer D. The simplification of the SCT procedures in developing countries has resulted in cost-lowering and availability to more patients. *Int J Hematol.* 2002;76:380–382.
- [6] Ruiz Arguelles GJ, Gomez-Almaguer D. The Mexican approach to conduct nonmyeloablative stem cell transplantation should not be overlooked. *Int J Hematol.* 2003;77:526–527.
- [7] Deeg HJ, Spitzer TR, Cottler-Fox M, Cahill R, Pickle LW. Conditioning-related toxicity and acute graft-versus-host disease in patients given methotrexate/cyclosporine prophylaxis. *Bone Marrow Transplant.* 1991;7:193–8.
- [8] Yu LC, Wall DA, Sandler E, Chan KW, Grayson G, Kletzel M. Unrelated cord blood transplant experience by the pediatric blood and marrow transplant consortium. *Pediatr Hematol Oncol.* 2001;18:235–45.

- [9] Woolfrey AE, Gooley TA, Sievers EL, Milner LA. Bone marrow transplantation for children less than 2 years of age with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Blood*. 1998;92:3546–3556.
- [10] Marco F, Bureo E, Ortega JJ, Badell I. High survival rate in infant acute leukemia treated with early high-dose chemotherapy and stem-cell support. *J Clin Oncol*. 2000;18:3256–3261.
- [11] Vassal G, Gouyette A, Hartmann O. Pharmacokinetics of high-dose busulfan in children. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1992;24:386–390.
- [12] Cavallaro AM, Lilleby K, Majolino I, et al. Three to six year follow-up of normal donors who received recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25:85–9.
- [13] Pulsipher MA, Nagler A, Iannone R. Weighing the risks of G-CSF administration, leukopheresis, and standard marrow harvest: ethical and safety considerations for normal pediatric hematopoietic cell donors. *Pediatr Blood Cancer*. 2006;46:422–433.
- [14] Reed W, Smith R, Dekovic F, Lee JY. Comprehensive banking of sibling donor cord blood for children with malignant and nonmalignant disease. *Blood*. 2003;101:351–357.
- [15] Rocha V, Gluckman E. Eurocord and European Blood and Marrow Transplant Group. Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12:34–41.
- [16] Sirchia G, Rebulli P, Tibaldi S, Lecchi L. Cost of umbilical cord blood units released for transplantation. *Transfusion*. 1999;39:645–650.
- [17] Terakura S, Azuma E, Murata M, et al. Hematopoietic engraftment in recipients of unrelated donor umbilical cord blood is affected by the CD34⁺ and CD8⁺ cell doses. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13:822–830.
- [18] Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood*. 2002;100:1611–1618.
- [19] Tsuji Y, Ito S, Isoda T, Kajiwara M. Successful nonmyeloablative cord blood transplantation for an infant with malignant infantile osteopetrosis. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2005;27:495–498.
- [20] Uckan D, Cetin M, Yigitkanli I, Tezcan I. Life-threatening neurological complications after bone marrow transplantation in children. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35:71–76.
- [21] Rubin J, Wide K, Remberger M, Gustaffsson B. Acute neurological complications after hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Transplant*. 2005;9:62–67.
- [22] Slavin S, Nagler A, Naparstek E, et al. Non-myeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood*. 1998;91:756–763.
- [23] Giralt S, Estey E, Albitar M, et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood*. 1997;89:4531–4536.
- [24] Gonzalez O, Mancias C, Cantu OG, et al. Bone marrow transplantation in a child with hemophagocytic lymphohistiocytosis using a less toxic conditioning regimen. *Arch Med Res*. 1999;30:338–40.
- [25] Gomez-Almaguer D, Ruiz-Arguelles GJ, Tarin-Arzaga LC, et al. Reduced-intensity stem cell transplantation in children and adolescents: the Mexican experience. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003;157–161.
- [26] Slavin S. Smarter rather than stronger treatment of haematological malignancies and non-malignant indications for stem-cell transplantation. *Lancet*. 2004;364:122–124.
- [27] Shenoy S, Grossman WJ, DiPersio J, Yu LC. A novel reduced-intensity stem cell transplant regimen for nonmalignant disorders. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35:345–352.
- [28] Rao K, Amrolia PJ, Jones A, Cale CM. Improved survival after unrelated donor bone marrow transplantation in children with primary immunodeficiency using a reduced-intensity conditioning regimen. *Blood*. 2005;105:879–885.
- [29] Bacigalupo A, Loacelli F, Lanino E, Marsh J. Fludarabine, cyclophosphamide and anti-thymocyte globulin for alternative donor transplants in acquired severe aplastic anemia: a report from the EBMT-SAA Working Party. *Bone Marrow Transplant*. 2005;36:947–950.
- [30] Steiner M, Matthes-Martin S, Attarbaschi A, Minkov M. Improved outcome of treatment-resistant high-risk Langerhans cell histiocytosis after allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant*. 2005;36:215–225.

- [31] Cooper N, Rao K, Gilmour K, Hadad L. Stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 2006;107:1233–36.
- [32] Kosaka Y, Koh K, Kinukawa N, Wakazono Y. Infant acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangements: outcome following intensive chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2004;104:3527–3534.

PUBLICACIÓN 7 - TRADUCCIÓN

Trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas empleando un régimen de acondicionamiento de intensidad reducida en infantes: Experiencia de una sola Institución en México.

Gonzalez Llano O, Jaime Perez JC, Cantu Rodriguez O, Mancias Guerra C, Gutiérrez Aguirre H, Herrera Garza JL, Rodriguez-Romo L, Gomez Almaguer D.

Pediatric Hematology and Oncology 2008;25:39–47.

Los autores reportan su experiencia con el trasplante de células madre hematopoyéticas en infantes de un hospital universitario en México. Los cinco niños tenían alguno de los siguientes diagnósticos: leucemia linfoblástica aguda, osteopetrosis -paciente que requirió dos procedimientos-, histiocitosis aguda de células de Langerhans diseminada y multiorgánica, y dos casos de linfocitosis hemofagocítica. En dos de los pacientes la fuente de las células madre fue sangre periférica y, en los otros 3, fue de unidades de sangre de cordón de donantes no relacionados. El régimen de acondicionamiento de intensidad reducida que se administró incluyó: fludarabina, ciclofosfamida y melfalan. Tres de los pacientes son supervivientes del trasplante y se encuentran libres de enfermedad y sin enfermedad injerto contra huésped después de 46, 34 y 16 meses.

Introducción

Es importante mencionar que, en los países en desarrollo como el nuestro, parece haber dos factores clave para que no sean trasplantados aquellos niños que tienen una indicación para el procedimiento, uno es la carencia de un donante HLA compatible [4] y, el otro, el alto coste económico que esta modalidad de tratamiento representa [5,6]. La atención de pacientes menores de 18 meses de edad puede representar un obstáculo adicional para llevar a cabo el TCH.

Pacientes y Metodos

Se presenta la experiencia de nuestro grupo mediante una revisión retrospectiva de una serie de seis TCH realizados en cinco pacientes; todos ellos menores de 18 meses en el momento del procedimiento, con diferentes enfermedades hematológicas y todos

trasplantados en un hospital público de México, el Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

El grupo de pacientes lo constituían cinco lactantes, un varón y cuatro niñas, de entre 7 y 14 meses de edad al iniciar el procedimiento del TCH. Dos de los pacientes tenían diagnóstico de linfocitosis hemofagocítica (LHH), los otros tres pacientes presentaban leucemia linfoblástica aguda (LLA) (un caso), histiocitosis de células de Langerhans de la variedad aguda con afectación multiorgánica (un caso) y osteopetrosis (OP), en esta paciente fueron practicados dos procedimientos.

Las células hematopoyéticas (CH) fueron obtenidas de la siguiente manera, en el caso del paciente con LLA, el donante fue su hermano mayor, en ese entonces de 22 meses de edad; en uno de los pacientes con LHH el donante fue su padre, un varón de 26 años, en ambos casos los donantes tenían un HLA idéntico al de los pacientes. Asimismo, en estos dos casos las CH se obtuvieron de la sangre periférica de los donantes, previa estimulación con factor estimulante de colonias granulocíticas durante cinco días.

Por otro lado, las CH de los otros cuatro trasplantes fueron obtenidas de unidades de sangre de cordón umbilical. En todos los TCH se empleó un régimen de acondicionamiento de intensidad reducida (RAIR) utilizando una combinación de fludarabina, a $30\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$ durante tres días, ciclofosfamida a $350\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$ durante tres días, y melfalan a $70\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$ durante dos días. En la paciente con OP se realizaron dos procedimientos, en el segundo, con la intención de lograr el prendimiento del injerto no conseguido inicialmente, se agregó globulina anti-linfocito al régimen de acondicionamiento.

La cifra de células CD34+ trasplantadas se midió por citometría de flujo; en los casos donde se obtuvieron de sangre periférica se administraron 9 y $5.59 \times 10^6/\text{Kg}$ de peso del receptor; y en los trasplantes donde las células se obtuvieron de unidades de cordón umbilical, fueron infundidas 1.63 , 2.37 , 2.40 y 3.71×10^5 células CD34+ y 2.43 , 2.90 , 7.40 y 6.80×10^6 células nucleadas/Kg de peso del receptor, respectivamente.

En la prevención de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) se empleó una combinación de ciclosporina A y tres dosis de metotrexato en los dos pacientes donde se

infundieron CH de sangre periférica y en dos de los pacientes de los que recibieron unidades de sangre de cordón umbilical (el primero de los procedimientos en la paciente con OP y el caso del paciente con LHH donde el hermano fue el donante de las CH); en los otros dos TCH de sangre de cordón umbilical se utilizó una combinación de ciclosporina A y metilprednisolona.

Resultados

Se definió como recuperación hematológica la demostración de una cifra de neutrófilos totales $>0.5 \times 10^9/L$ y una cuenta de plaquetas $>20 \times 10^9/L$, esta recuperación hematológica se obtuvo en cuatro de los seis TCH en los días 13, 17, 20 y 38 para neutrófilos, y en los días 17, 20, 33 y 38 para plaquetas. No se obtuvo recuperación hematológica en ninguno de los procedimientos efectuados en la paciente con osteopetrosis.

El prendimiento de los TCH fue completo en tres de los cinco pacientes, en el caso número 1 fue demostrada por análisis de cromosomas sexuales por hibridación *in situ* fluorescente (FISH), y en los pacientes 4 y 5 a través de estudios de quimerismo por microsatélites. No ocurrió prendimiento en ninguno de los dos TCH de la niña con OP y no se practicó en el paciente con LHH que desarrolló EICH aguda y grave.

Tres pacientes presentaron EICH aguda, uno de ellos tuvo solo enfermedad intestinal leve que respondió favorablemente a la administración de corticoesteroides; otro de ellos, con afectación intestinal grado III, no respondió al tratamiento con corticoesteroides por lo que se inició Alemtuzumab a 3mg/día durante cinco días, obteniéndose remisión completa de la EICH. La paciente con LHH desarrolló EICH grave por afectación intestinal y no se obtuvo respuesta a pesar del tratamiento con corticoesteroides, ciclosporina A, anticuerpo contra el factor de necrosis tumoral, micofenolato de mofetilo y globulina anti-timocito; la paciente falleció a los 65 días post trasplante por sepsis secundaria a la inmunosupresión grave.

La paciente con HCL desarrolló manifestaciones neurológicas agudas que incluyeron convulsiones y alteraciones en el estado de la conciencia, se determinó que lo anterior era

secundario a la administración de la ciclosporina A, por lo que fue suspendida, iniciándose micofenolato de mofetilo.

En el momento del envío del informe de nuestros casos, tres de los cinco pacientes se encontraban vivos y libres de la enfermedad de base 46, 34 y 16 meses después del trasplante. Fallecieron dos pacientes, la niña con LHH y EICH grave que fue mencionada arriba, y la paciente de la OP, 570 días después del trasplante por progresión de su enfermedad.

Discusión

Consideramos que el desarrollo de métodos que permitan incrementar el número de procedimientos, y con esto mejorar el pronóstico y la calidad de vida de estos pacientes, debe ser una estrategia de los equipos de trasplante [6].

En niños pequeños, como los lactantes que describimos en esta serie, se han podido establecer dos condiciones muy importantes, por un lado, una mayor tasa de prendimiento del injerto, y por lo tanto menor número de fracasos, y, por otro, una menor probabilidad de EICH explicado por la inmadurez del sistema inmunológico propia de los niños de este grupo de edad; asimismo, y por la misma explicación, se han observado también mejores resultados en los TCH de niños de esta edad con trasplantes que se llevan a cabo con donantes no emparentados familiarmente [10,11].

También se ha determinado una farmacocinética diferente para estos pacientes que no les impide someterse a esta modalidad terapéutica si cumplen con los criterios requeridos para el procedimiento.

En nuestro paciente con LLA donde su hermano fue el donante de las CH, se llevó a cabo la estimulación con factor estimulante de colonias granulocíticas. A pesar de que se ha sugerido el riesgo teórico que corren los donantes sanos expuestos a esta estimulación, no hay en la actualidad una contraindicación para su administración; nuestro donante se encontraba totalmente sano seis años después del TCH, cuando lo consultamos por última vez [12,13].

Los TCH utilizando regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida (RAIR) fueron originalmente diseñados para pacientes adultos [22,23], en los que un trasplante mieloablatoivo convencional no podía ser llevado a cabo previendo una tasa alta de morbilidad y mortalidad. Por ello, es difícil entender que si los médicos de adultos trataban de cuidar a sus pacientes implementando este tipo de estrategias, los médicos pediatras requirieramos más tiempo para empezar a pensar en proteger a nuestros niños [24-31] utilizando esquemas que, al menos teóricamente, fueran menos tóxicos, tanto a corto como a largo plazo. Creemos también que los RAIR ofrecen otras ventajas, como la reducción de los requerimientos transfusionales, prendimientos del injerto más rápidos con reducción en las probabilidades de complicaciones infecciosas, y, además, la posibilidad de llevarlos cabo de manera ambulatoria, reduciendo, de esta forma, el coste económico del procedimiento [24,25].

explain the complex pathophysiology and phenotypic diversity associated with congenital FV deficiency.

Acknowledgements

KT and JS are co-first authors. This study was supported by a Heart and Stroke Foundation of British Columbia and Yukon Grant in Aid (to ELGP). We acknowledge the use of equipment supported by the Canadian Foundation for Innovation and administrative support provided by the Michael Smith Research Foundation awarded to the University of British Columbia, Centre for Blood Research.

Kimberley Talbot^{1,2,3}

Jina Song^{1,2,3}

Jeff Hewitt^{3,4}

Katherine Serrano^{1,2,3}

Michael Ho^{3,4}

Cedric J. Carter^{2,3}

Ross T. A. MacGillivray^{3,4}

Edward L. G. Pryzdial^{1,2,3}

¹Canadian Blood Services, Research and Development, ²Pathology and Laboratory Medicine, ³Centre for Blood Research, and ⁴Biochemistry and Molecular Biology, University of British Columbia, Vancouver, Canada.
E-mail: ed.pryzdial@blood.ca

References

- Castoldi, E., Lunghi, B., Mingozzi, F., Muleo, G., Redaelli, R., Mariani, G. & Bernadi, F. (2001) A missense mutation (Y1702C) in the coagulation factor V gene is a frequent cause of factor V deficiency in the Italian population. *Haematologica*, **86**, 629–633.
- Cui, J., O'Shea, K.S., Purkayastha, A.A., Saunders, T.L. & Ginsberg, D. (1996) Fatal haemorrhage and incomplete block to embryogenesis in mice lacking coagulation factor V. *Nature*, **384**, 66–68.
- Duckers, C., Simioni, P., Spiezia, L., Radu, C., Gavasso, S., Rosing, J. & Castoldi, E. (2008) Low plasma levels of tissue factor pathway inhibitor in patients with congenital factor V deficiency. *Blood*, **112**, 3615–3623.
- Duckers, C., Simioni, P., Rosing, J. & Castoldi, E. (2009) Advances in understanding the bleeding diathesis in factor V deficiency. *British Journal of Hematology*, **146**, 17–26.
- Duckers, C., Simioni, P., Spiezia, L., Radu, C., Dabrilii, P., Gavasso, S., Rosing, J. & Castoldi, E. (2010) Residual platelet factor V ensures thrombin generation in patients with severe congenital factor V deficiency and mild bleeding symptoms. *Blood*, **115**, 879–886.
- Guasch, J.F., Cannegieter, S., Reitsma, P.H., van 't Veer-Korthof, E.T. & Bertina, R.M. (1998) Severe coagulation factor V deficiency caused by a 4 bp deletion in the factor V gene. *British Journal of Hematology*, **101**, 32–39.
- Jenny, R.J., Pittman, D.D., Toole, J.J., Kriz, R.W., Aldape, R.A., Hewick, R.M., Kaufman, R.J. & Mann, K.G. (1987) Complete cDNA and derived amino acid sequence of human factor V. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **84**, 4846–4850.
- Krishnaswamy, S., Nesheim, M.E., Pryzdial, E.L. & Mann, K.G. (1993) Assembly of prothrombinase complex. *Methods in Enzymology*, **222**, 260–280.
- Lak, M., Sharifian, R., Peyvandi, F. & Mannucci, P.M. (1998) Symptoms of inherited factor V deficiency in 35 Iranian patients. *British Journal of Haematology*, **103**, 1067–1069.
- Montefusco, M.C., Duga, S., Asselta, R., Malcovati, M., Peyvandi, F., Santagostino, E., Mannucci, P.M. & Tenchini, M.L. (2003) Clinical and molecular characterization of 6 patients affected by severe deficiency of coagulation factor V: broadening of the mutational spectrum of factor V gene and in vitro analysis of the newly identified missense mutations. *Blood*, **102**, 3210–3216.

Keywords: factor V, deficiency, intrinsic pathway, platelets, coagulation.

First published online 25 August 2010
doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08336.x

Outpatient reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia in children

The prognosis of childhood acute myeloid leukaemia (AML) has improved over the last four decades. Nowadays, more than 80% of children with AML achieve remission and half of these cases maintain remission and achieve long-term cure. Intensification of dose, increased number of days of conventional induction chemotherapy, human leucocyte antigen-matched family donor stem cell transplantation (MFD-SCT) in first remission and risk stratification of treatment have all contributed to this progress (Woods *et al*, 2001). For children in remission with a sibling donor

the therapy of choice is allogeneic SCT (allo-SCT) (Woods *et al*, 2001; Bleakley *et al*, 2002). The cost of a myeloablative transplant is beyond the reach of the majority of patients in the developing world. Several methods of reduced intensity conditioning (RIC) have been described worldwide.

The outcome of eight paediatric patients diagnosed with AML without favourable cytogenetics, between June 2002 and May 2010, who achieved complete remission after induction, and underwent RIC allo-SCT was assessed. The other clinical

Table I. Clinical details of paediatric acute myeloid leukaemia patients.

Characteristic	No. of patients	Median (range)
Age (years)		12.5 (6–19)
Sex (male/female)	4/4	
FAB classification		
M0	–	
M1	1	
M2	4	
M4	2	
M5	1	
M6	–	
M7	–	
WBC at diagnosis ($\times 10^9/l$)		11.56 (1.5–400)
Time to complete remission (d)		29 (25–37)
Extramedullary disease	1	

FAB, French-American-British; WBC, white blood cell count.

characteristics are described in Table I. All patients received a cytarabine–anthracycline (7 + 3) based induction regimen (plus etoposide for M4 and M5 variants). Following induction chemotherapy all patients underwent bone marrow examination. Post-remission chemotherapy consisted of high-dose cytarabine (HiDAC) plus etoposide for a median of four courses.

Preparative regimen: The children were conditioned with busulfan (4 mg/kg/day p.o.) on days –6, –5, cyclophosphamide (350 mg/m²/day) and fludarabine (30 mg/m²/day) on days –4 to –2.

Haematopoietic stem cell mobilization and peripheral blood stem cell apheresis: Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF; 10 µg/kg/d) was administered to donors on days –4 to –1, and aphereses were performed on day 0. Enumeration of CD34⁺ cells was done by flow cytometry.

Graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis: Cyclosporin (CyA) 5 mg/kg p.o. divided in two doses from day –1 and methotrexate at 5 mg/m² on days +1, +3 and +6 were administered. If severe acute GVHD (aGVHD; grade III–IV) did not occur, the dose of cyclosporin was gradually reduced until withdrawal at day +90 post-transplant.

Infection prophylaxis: Trimethoprim sulfamethoxazole was administered from days –7 to –2 and nitazoxanide from days –4 to –2. Ciprofloxacin, itraconazole and acyclovir were administered from day –1 until myeloid engraftment; thereafter trimethoprim sulfamethoxazole and acyclovir were administered at prophylactic doses until day +180 from transplant.

Engraftment: Myeloid engraftment was defined as the first of three consecutive days when the neutrophil count was $\geq 0.5 \times 10^9/l$, and platelet engraftment was defined as the first of three consecutive days of unsupported platelet count $\geq 50 \times 10^9/l$. Chimaerism was evaluated by fluorescent hybridization if the recipient and donor were sex-mismatched, or by microsatellite molecular biology if the recipient and donor were sex-matched.

All patients received conditioning on an out-patient basis. Neutrophil and platelet engraftment was achieved on (median) days +20 and 13.5, respectively. All patients achieved complete chimaerism. Only three patients developed aGVHD grade II, with full response to prednisone 1–2 mg/kg/day. One patient developed aGVHD grade III at sixth months post-transplant; the disease was refractory to ciclosporin and prednisone and, despite receiving alemtuzumab, the patient died 1 week later due brain stem vasculitis. Three patients developed limited chronic GVHD, which resolved in two and one continues to present with immune thrombocytopenia but is asymptomatic and not receiving treatment. There were no infectious complications. Overall survival was 75% and event-free survival was 87.5% with a median follow-up of 36 months (12–96). The patient who relapsed died 1 month later from disease progression. The median age of the donors was 14.5 years (range 5–22); only five needed a central line to collect the graft. There were no complications in donors.

Aggressive induction protocols have improved the remission rate of patients affected by AML. Adequate post-remission therapy remains essential to reduce the risk of leukaemia relapse and to obtain a definitive cure for children with AML (Woods *et al*, 2001). Regardless of the mobilization and collection protocol employed, there are risks for the donor, but there is currently no evidence to suggest that there is an increased risk of malignancy associated with a single short course or longer courses of G-CSF therapy. Adverse and/or toxicity events following leukapheresis are not more frequent or severe than those reported after general anaesthesia and bone marrow harvesting. The Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium demonstrated that, in over 200 collections, peripheral blood stem cell (PBSC) collection was safe in normal paediatric donors and the desired CD34 cell yields are easily achieved (Pulsipher *et al*, 2005).

Allo-SCT is the best choice if a sibling donor is available, because of a lower incidence of transplant-related mortality and higher probability of leukaemia-free survival (Berger *et al*, 2005). RIC allo-SCT offers several advantages over myeloablative conditioning regimens, including decreased acute morbidity and mortality and potentially reduced late effects, but it still maintains the benefits of the graft-versus-leukaemia effect. The RIC regimens provide early immunosuppression, optimizing leukaemia control as well as allowing for successful engraftment. Ho *et al* (2004) showed that bone marrow status before RIC allo-SCT significantly affected outcome. Del Toro *et al* (2004) reported that RIC allo-SCT was feasible and tolerable, with $\geq 90\%$ patients achieving $\geq 98\%$ donor chimaerism. Preliminary results have showed that RIC allo-SCT followed by gemtuzumab ozogamicin is safe and well tolerated for paediatric AML patients (Roman *et al*, 2005). An additional disadvantage to the myeloablative approach is the late effects, which can be quite detrimental of the developing child or adolescent, including the potential for growth retardation, infertility, and secondary malignancy.

Several studies from Mexico regarding the use of outpatient RIC allo-SCT in children showed that this transplant modality was safe, effective and feasible, and, given the limited availability of funds to carry out conventional transplants, this outpatient procedure is standard practice in our centre (Gómez-Almaguer *et al*, 2003; Llano *et al*, 2008). Our group has previously reported good results in adult patients with AML and RIC allo-SCT, showing a 50% overall survival. Despite the low number of patients reported and the short follow-up, our data suggest that RIC allo-SCT in paediatric AML patients after first remission produces encouraging results (Gutierrez- Aguirre *et al*, 2007).

Laura Rodríguez-Romo
Consuelo Mancias-Guerra
Oscar González-Llano
José Carlos Jaime-Pérez
Sylvia Martínez-Cabriales
Fernando García-Rodríguez
David Gómez-Almaguer

Servicio de Hematología del Hospital Universitario "Dr José E. González". Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, NL, Mexico.

E-mail: hematoped@gmail.com

References

- Berger, M, Ferrero, I, Vassallo, E, Gastaldo, L, Carraro, F, Biasin, E, Madon, E & Fagioli, F (2005) Stem cell transplantation as consolidation therapy for children in first-remission AML: a single-center report. *Pediatric Hematology and Oncology*, **22**, 597–608.
- Bleakley, M, Lau, L, Shaw, PJ & Kaufman, A (2002) Bone marrow transplantation for paediatric AML in first remission: a systematic review and meta-analysis. *Bone marrow transplantation*, **29**, 843–852.
- Del Toro, G, Satwani, P, Harrison, L, Cheung, YK, Brigid Bradley, M, George, D, Yamashiro, DJ, Garvin, J, Skerrett, D, Bessmertny, O, Wolownik, K, Wischhover, C, van de Ven, C & Cairo, MS (2004) A pilot study of reduced intensity conditioning and allogeneic stem cell transplantation from unrelated cord blood and matched family donors in children and adolescent recipients. *Bone Marrow Transplantation*, **33**, 613–622.
- Gómez-Almaguer, D, Ruiz- Argüelles, GJ, Tarín-Arzaga Ldel, C, González-Llano, O, Jaime- Pérez, JC, López-Martínez, B, Cantú-Rodríguez, OG & Herrera- Garza, JL (2003) Reduced-intensity stem cell transplantation in children and adolescents: the Mexican experience. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, **9**, 157–161.
- Gutierrez- Aguirre, CH, Cantú- Rodríguez, OG, Gonzalez-Llano, O, Salazar-Riojas, R, Martinez-González, O, Jaime- Pérez, JC, Morales-Toquero, A, Tarín- Arzaga, LC, Ruiz- Argüelles, GJ & Gómez-Almaguer, D (2007) Non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation is of limited value in advanced or refractory acute myeloblastic leukemia. The Mexican experience. *Hematology*, **12**, 193–197.
- Ho, AY, Pagliuca, A, Kenyon, M, Parker, JE, Mijovic, A, Devereux, S & Mufti, GJ (2004) Reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia using fludarabine, busulphan, and alemtuzumab (FBC) conditioning. *Blood*, **104**, 1616–1623.
- Llano, OG, Perez, JC, Rodriguez, OC, Guerra, CM, Aguirre, HG, Garza, JL, Rodriguez-Romo, L & Almaguer, DG (2008) Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using a reduced-intensity conditioning regimen in infants: experience at a single institution in Mexico. *Pediatric Hematology and Oncology*, **25**, 39–47.
- Pulsipher, MA, Levine, JE, Hayashi, RJ, Chan, KW, Anderson, P, Duerst, R, Osunkwo, I, Fisher, V, Horn, B & Grupp, SA (2005) Safety and efficacy of allogeneic PBSC collection in normal pediatric donors: the pediatric blood and marrow transplant consortium experience (PBMTTC) 1996–2003. *Bone Marrow Transplantation*, **35**, 361–367.
- Roman, E, Cooney, E, Harrison, L, Militano, O, Wolownik, K, Hawks, R, Foley, S, Satwani, P, Unal, E, Bhatia, M, Bradley, B, Del Toro, G, George, D, Garvin, J, van de Ven, C & Cairo, MS (2005) Preliminary results of the safety of immunotherapy with gemtuzumab ozogamicin following reduced intensity allogeneic stem cell transplant in children with CD33+ acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research*, **11**, 7164s–7170s.
- Woods, WG, Neudorf, S, Gold, S, Sanders, J, Buckley, JD, Barnard, DR, Dusenbery, K, DeSwarte, J, Arthur, DC, Lange, BJ & Koblinsky, NL & Children's Cancer Group. (2001) A comparison of allogeneic bone marrow transplantation, autologous bone marrow transplantation, and aggressive chemotherapy in children with acute myeloid leukemia in remission: a report from the Children Cancer Group. *Blood*, **97**, 56–62.

Keywords: AML, paediatric stem cell transplant, reduced intensity conditioning.

First published online 25 August 2010

doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08353.x

Pandemic influenza A (2009-H1N1) infection in paediatric oncology patients in Hong Kong

The overall clinical picture of pandemic H1N1 infection in two of the most vulnerable patient groups – paediatric oncology and

haematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients is not fully understood. Traditionally, severely immunocompromised

PUBLICACIÓN 8 - TRADUCCIÓN

Trasplante alogénico de células madre ambulatorio de intensidad reducida en niños con leucemia mieloide aguda.

Rodríguez-Romo L, Mancias-Guerra C, González-Llano O, Jaime-Pérez JC, Martínez-Cabriales S, García-Rodríguez F, Gómez-Almaguer D.

British Journal of Haematology 2010;151:200–202.

El pronóstico de los niños con leucemia mieloide aguda (LMA) ha mejorado en los últimos cuarenta años. En la actualidad, más del 80% de los niños obtendrán la remisión, y la mitad de ellos la mantendrán para convertirse en pacientes curados. La intensificación de la dosis, el incremento en el número de días de la quimioterapia de inducción convencional, los trasplantes en primera remisión de donante familiar idéntico y la estratificación de tratamientos de acuerdo al riesgo de recaídas han contribuido al progreso en el pronóstico de esta enfermedad [Woods et al, 2001]. Para los niños que cuenten con un donante familiar idéntico la terapia de elección es el trasplante alogénico de células madre (TCT-Alo) [Woods et al., 2001].

Se evaluó el seguimiento de ocho niños con LMA que no contaban con una citogenética favorable, entre junio de 2002 y mayo de 2010. Los niños fueron sometidos a un TCT-Alo y habían obtenido remisión completa. Otras características están descritas en la Tabla I. Todos los pacientes recibieron un esquema de inducción basado en la combinación de citarabina y un antracíclico (7+3) (más etopósido en las variantes M4 y M5). Después de la quimioterapia de inducción todos los pacientes se sometieron a un estudio de la médula ósea. La quimioterapia post-remisión consistió en la administración de dosis altas de citarabina (DAAC) y etopósido a una mediana de cuatro ciclos.

Régimen preparativo. Los niños fueron acondicionados con busulfan (4mg/Kg/día por vía oral) en los días -6, -5, ciclofosfamida (350mg/m²/día) y fludarabina (30mg/m²/día) en los días -4 a -2.

Movilización de las células madre hematopoyéticas y aféresis de las células madre de sangre periférica. Se administró a los donantes 10µg/Kg/día de factor estimulante de colonias granulocíticas (fec-g) durante cinco días desde el día -4. El procedimiento de

aféresis se realizó en el día 0. La cuantificación de las células CD34+ se llevó a cabo por citometría de flujo.

Profilaxis para la enfermedad de injerto contra huésped (EICH). Se administró 5mg/Kg/día ciclosporina A (CyA) por vía oral, dividida en dos dosis, iniciando en el día -1, y metotrexato a 5mg/Kg en los días +1, +3 y +6. Si no se presentaba EICH aguda grave III-IV, la dosis de CyA era gradualmente reducida hasta suspender en el día +90 del trasplante.

Profilaxis para infecciones. Se administraron trimetoprim sulfametoxazol, nitasoxanida, ciprofloxacina, itraconazol y acyclovir.

Prendimiento. El prendimiento mieloide fue definido como el primer día de tres consecutivos con cuentas de neutrófilos totales $>0.5 \times 10^9/L$, y el prendimiento plaquetario fue definido como el primer día de tres consecutivos sin soporte plaquetario con cuentas $>50 \times 10^9/L$. El estudio de quimerismo fue evaluado mediante hibridación *in situ* fluorescente si el donante y el receptor eran de sexo diferente, o por microsatélites si eran del mismo sexo.

Todos los pacientes recibieron el régimen de acondicionamiento de manera ambulatoria. El prendimiento de neutrófilos y plaquetas se obtuvo con una mediana de 20 y 13.5 días, respectivamente. Todos los pacientes obtuvieron un quimerismo completo. Solo tres pacientes desarrollaron EICH aguda grado II con respuesta completa a prednisona a 1-2mg/kg/día. Un paciente desarrolló EICH aguda grado III a los seis meses del trasplante, fue refractario a ciclosporina, prednisona y alemtuzumab, falleciendo una semana después por vasculitis del tallo cerebral. Tres pacientes presentaron EICH crónica limitada, dos de ellos están libres de esta complicación y uno continúa con síntomas leves, además presenta trombocitopenia inmune sin síntomas y no recibe tratamiento. La supervivencia global es del 75% y la supervivencia libre de evento del 87.5% con una mediana de seguimiento de 36 meses (12-96). La mediana de edad de los donantes fue de 14.5 años (5-22), sólo cinco requirieron un catéter central para la recolección de las células. No hubo complicaciones en los donantes.

Los eventos adversos y tóxicos después de la leucoféresis no son más frecuentes ni graves que los reportados después de anestesia general para obtener las CH de la médula ósea. El Consorcio pediátrico de trasplantes de sangre y médula ósea demostró en más de 200 recolecciones que la obtención de células madre de sangre periférica es segura en donantes pediátricos normales y que la cantidad deseada de células CD34+ se obtiene fácilmente [Pulsipher *et al.*, 2005].

El TCT-Alo con un régimen de acondicionamiento de intensidad reducida(RAIR) ofrece varias ventajas sobre los trasplantes con regímenes mieloablativos, incluyendo una disminución en la morbilidad y mortalidad aguda y, potencialmente, una reducción en los efectos tardíos manteniendo aún el efecto de injerto contra leucemia. Los trasplantes con los RAIR proveen inmunosupresión temprana y optimización en el control de la leucemia permitiendo el prendimiento del injerto. Ho *et al.* (2004) demostraron que el estado de la médula ósea antes del trasplante con RAIR afectaba significativamente el seguimiento. Del Toro *et al.* (2004) reportaron que los TCT-Alo con RAIR eran realizables y tolerables con >90% de los pacientes obteniendo >98% de quimerismo del donante. Resultados preliminares han demostrado también que esta variedad de trasplantes, seguidos de la administración de gemtuzumab ozogamicina, es segura y bien tolerada en pacientes pediátricos con LMA [Roman *et al.*, 2005]. Una desventaja adicional de los trasplantes mieloablativos es la que se refiere a los efectos adversos, ya que estos pueden ser perjudiciales para el desarrollo del niño o adolescente, incluyendo el potencial retardo en el crecimiento, infertilidad y malignidades secundarias.

Varios estudios realizados en México a propósito del uso de TCT-Alo con RAIR y de manera ambulatoria han demostrado que esta modalidad de trasplantes es segura, efectiva y realizable, y, dada la dificultad para la obtención de fondos económicos suficientes para llevar a cabo los trasplantes convencionales, la práctica ambulatoria es la estándar en nuestro Centro [Gómez-Almaguer *et al.*, 2003; Llano *et al.*, 2008]. A pesar del pequeño número de pacientes referidos y del corto seguimiento, nuestros datos sugieren que el TCT-Alo con un RAIR en pacientes pediátricos con LMA, después de haber obtenido la primera remisión, produce resultados alentadores [Gutierrez- Aguirre 2007].

Long-term results of placental blood allografting using reduced-intensity conditioning: multicenter experience in a developing country

Guillermo J. Ruiz-Delgado^{1,2}, Consuelo Mancias-Guerra³, Julio Macias-Gallardo¹, Oscar Gonzalez-Llano³, Ana Hernandez-Arizpe¹, Laura Nelly Rodriguez-Romo³, Sylvia Aide Martinez-Cabriales³, David Gómez-Almaguer³, Guillermo J. Ruiz-Argüelles^{1,2}

¹Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla, ²Laboratorios Clínicos de Puebla, Clínica Ruiz, Puebla, Mexico, ³Hospital Universitario, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Mexico

Background: Placental blood (PLB) hematopoietic stem cell transplantation has recently been explored in an increasing number of patients; the best conditioning regimen has not been established.

Material and methods: In an eight-year period, 66 consecutive patients, both children and adults (40 males and 26 females), were grafted with allogeneic placental blood cells using a reduced-intensity conditioning regimen: 23 patients were grafted because of a non-malignant condition and 43 patients for a malignant disease. The median age was 7 years (range 5 months to 72 years).

Results: Median time to recover $>0.5 \times 10^9/l$ granulocytes was 19 days, whereas median time to recover $>20 \times 10^9/l$ platelets was 23 days. Thirty-eight individuals failed to engraft and they either recovered endogenous hematopoiesis or died. Patients have been followed for periods ranging from 0.5 to 66 months, median 9 months. The median overall post-transplant survival (OS) was 22 months and the 36-month OS was 32%; it was significantly better for individuals grafted with 6/6 matched cords (45%). The cumulative incidences of grade II–IV acute graft-versus-host disease (GVHD) and grade III–IV acute GVHD for the patients who engrafted were 33 and 10%, respectively.

Discussion: The low engraftment rate should be improved by selecting better cord blood units; additional studies are needed to define if non-myeloablative conditioning is preferable over conventional conditioning.

Keywords: Allografts, Placental blood, Umbilical cord, Reduced-intensity

Introduction

Placental blood (PLB) hematopoietic stem cell transplantation has recently been explored in an increasing number of patients. The relative ease of procurement and the lower than anticipated risk of acute graft-versus-host disease (GVHD) has made PLB transplantation an appealing alternative to bone-marrow-derived hematopoietic stem cells.^{1–7} In order to reduce transplant-related toxicity, various non-myeloablative or reduced-intensity conditioning (RIC) regimens have been used as an alternative to conventional myeloablative conditioning and it has been shown that RIC allows engraftment of PLB stem cells.^{1,8–11} RIC to graft PLB broadens the scope

of patients who may benefit, including older and medically infirm patients without a matched donor.

The experience published in the literature with PLB transplantation in Mexico is limited: the first publication of PLB allograft was done in 2002⁷ and few have been done since then.^{8–11} We report herein our experience in allografting in two institutions in Mexico, 66 consecutive patients with PLB, using the ‘Mexican’ method of RIC preparative method.¹²

Material and Methods

Patients and PLB

All the patients consecutively allografted with PLB in the Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla (Puebla, Mexico) and the Hospital Universitario de Nuevo León (Monterrey, Mexico) after January 2002 were prospectively accrued in the study. Children and adult patients

Correspondence to: Guillermo J Ruiz-Argüelles, Centro de Hematología y Medicina Interna, Clínica Ruiz, 8B Sur 3710, 72530, Puebla, Mexico. Email: grui1@clinicaruiz.com

Table 1 Some data of the patients grafted with allogeneic PLB

<i>n</i>	Age (years)	Diagnosis	Source	Status	Time (months)
1	4	ALL	Sibling	Dead	10
2	0.91	Histiocytosis	NYBC	Dead	3
3	0.83	Osteopetrosis	NYBC	Alive	5
4*	1.25	Osteopetrosis	UANL	Dead	11
5	5	ALL	NYBC	Dead	0.3
6	38	ALL	NYBC	Dead	0.5
7	5	Wiskott Aldrich	Stemcyte	Dead	3
8	34	AML	CNTS	Dead	10
9	35	CML	CNTS	Dead	18
10	29	CML	UANL	Dead	8
11	5	ALL	Sibling	Dead	15
12	13	ALL	NYBC	Alive	23
13	72	CML	UANL	Alive	4
14	25	AA	NYBC	Dead	0.6
15	37	Hodgkin	NYBC	Dead	1
16	5	CML	NYBC	Dead	4
17	4	SCA	CNTS	Alive	11
18	27	PNH	UANL	Alive	42
19	13	AA	CNTS	Dead	0.5
20	31	CML	Stemcyte	Alive	44
21	5	ALL	CNTS	Dead	2
22	4	SCA	CNTS	Alive	11
23	0.42	Griscelli	UCCCB	Dead	0.5
24	34	AML	UCCCB	Dead	2
25	0.5	SCID	NYBC	Alive	27
26	15	Hodgkin	UANL	Dead	36
27	5	ALL	UANL	Dead	19
28	5	ALD	UCCCB (2)	Alive	5
29	23	Hodgkin	CNTS (2)	Dead	6
30	8	ALL	CNTS	Alive	29
31	3	ALL	Sibling	Dead	9
32	7	ALL	CNTS	Dead	2
33	3	ALL	CNTS	Dead	4
34	11	Thalassemia	CNTS (2)	Dead	0.5
35	12	Hodgkin	UCCCB (2)	Dead	4
36	1	ALL	NYBC	Alive	23
37	8	CML	UANL	Alive	23
38	1	ALL	Stemcyte	Alive	23
39	11	CML	Stemcyte	Alive	23
40	4	ALL	CNTS	Dead	2
41	7	Fanconi anemia	CNTS	Dead	1
42	6	JCMML	CNTS	Dead	4
43	31	Hodgkin	UCCCB (2)	Dead	0.4
44	1	SCID	Stemcyte	Alive	13
45	2	PK deficiency	NYBC	Alive	12
46	6	SCA/thalassemia	CNTS	Alive	11
47	1	SCID	CNTS	Alive	5
48	0.75	SCID	NYBC	Alive	13
49	3	Thalassemia	Sibling	Alive	25
50	3	ALL	Sibling	Dead	9
51	50	AML	UK NBS-CBB	Alive	66
52	3	ALL	Sibling	Alive	22
53	4	Hunter	Leuven CBB	Alive	57
54	5	ALL	UCCBB	Dead	4
55	19	AML	UCCBB	Dead	4
56	24	AA	USA Red Cross CBB	Alive	33
57	10	CML	CNTS	Alive	14
58	26	AML	CNTS	Alive	8
59	3	Blackfan Diamond	CNTS	Alive	5
60	14	ALL	HUNL	Alive	8
61	5	AA	Stemcyte	Alive	25
62*	7	AA	Sibling	Alive	17
63	40	ALL	CNTS (2)	Dead	1
64	21	AML	Barcelona CBB (2)	Dead	1
65	29	CML	CNTS(2)	Dead	2
66	20	ALL	UCCCB (2)	Dead	1
67	28	AML	Stemcyte (2)	Dead	22
68	18	AML	Australian CBB (2)	Dead	1

Note: Source refers to the place where the PLB were obtained.

*denotes second cord blood transplant.

Time refers to post-allograft period.

ALL=acute lymphoblastic leukemia, SCA=sickle cell anemia, AML=acute myelogenous leukemia, PNH=paroxysmal nocturnal

Table 1 Continued

hemoglobinuria, AA=aplastic anemia, CML=chronic myelogenous leukemia, PK=pyruvate kinase, ALD=adrenoleukodystrophy, JCMML=juvenile chronic myelomonocytic leukemia, SCID=severe combined immunodeficiency. NYBC=New York Blood Center, HUNL=Hospital Universitario de Nuevo León in Monterrey, México, CNTS=Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea in México City, México, UK=United Kingdom, NBS=National Blood Service, CBB=cord blood bank, UCCBB=University of Colorado Cord Blood Bank. (2)=denotes that two cords were grafted.

with an indication of an allograft and lacking a human leukocyte antigen (HLA) identical or compatible sibling were offered the PLB allograft. An initial search for cords was done in Mexican cord blood banks, which was followed by an international search if no matches were found in Mexico; patients were grafted if the PLB was available. Serological typing for HLA A and B *loci* was used until 2003; subsequently, molecular hybrid capture typing was used for these *loci*. Class II DR antigens were studied always by molecular biology. C locus studies were not performed in all individuals. PLB and recipients needed to be matched at the HLA A, B and DR *loci* to be considered HLA identical; the PLB were either HLA-compatible with 1–3 mismatches (3/6, 4/6, 5/6) or identical (6/6). Table 1 shows some of the patients features. All patients had a Karnofsky score of 100% when the procedure was performed. Institutional review board approval and written consent was obtained from all the individuals. Patients were grafted with hematopoietic stem cells stemming from one cord and, after October 2006, two cords were grafted to the recipients.

Conditioning and grafting

Per protocol, the Mexican RIC was used in all individuals:^{9–13} oral busulphan, 4 mg/kg was delivered on days –6 and –5; i.v. cyclophosphamide, 350 mg/m² on days –4, –3 and –2; i.v. fludarabine, 30 mg/m² on days –4, –3 and –2; oral cyclosporin A (CyA) 5 mg/kg was started on day –1 and i.v. methotrexate 5 mg/m² was delivered on days +1, +3, +5 and +11. Oral CyA was continued through day 180, with adjustments according to the levels of serum CyA; it was then tapered over 30–60 days. If GVHD data were present, the CyA tapering was done over longer periods. Ondansetron (4 mg po every 12 hours during chemotherapy and 2 days after, ciprofloxacin (250 mg *bid*) and itraconazole (100 mg *bid*) were used in all patients; antibiotics and antimycotics were used until more than 500 granulocytes/ul were present. The PLB cells were infused as outpatients on day 0.

Chimerism and molecular biology studies

In cases with a sex mismatch, a fluorescent *in situ* hybridization technique to demonstrate the X and Y chromosomes was done,^{14,15} whereas restriction fragment length polymorphism (RFLP)^{15,16} studies

in the peripheral blood lymphocytes were used in the other cases. The molecular markers of the underlying disease were detected by multiplex RT-PCR.^{15,17}

Results

Patients and PLB

Sixty-six both children and adults were grafted with allogeneic hematopoietic stem cells derived from 79 umbilical cords. There were 40 males and 26 females. Twenty-three patients were grafted because a non-malignant condition and 43 for a malignant disease; two patients received two consecutive cord blood grafts (Table 1). The median age was 7 years (range 5 months–72 years). Thirty-three PLB were obtained from Mexican cord bloods banks (25 from the Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea in Mexico City and 8 from the Hospital Universitario de Nuevo León in Monterrey); 7 cords were from HLA-compatible siblings and the remaining 39 were obtained from abroad, either the US or Europe (Table 1). There were eleven 6/6 matches, thirty-one 5/6 matches, thirty-six 4/6 matches and one 3/6. Fifty-seven procedures were done with a single cord, whereas 11 were done with two cords (Table 1). The allografts contained a median of 2.2×10^7 total nucleated cells/kg (range 0.006– 8.5×10^7 /kg) and a median of 1.25×10^5 CD34 cells/kg (range 0.01 to 22×10^5 /kg).

Engraftment and survival

Due to the heterogeneous nature of the group, only two variables were assessed: engraftment and OS. The granulocytes never dropped below 0.5×10^9 /l in two patients and 21 individuals never recovered $>0.5 \times 10^9$ /l granulocytes; in the remaining patients, median time to recover $>0.5 \times 10^9$ /l granulocytes was 19 days (range 10–55 days). The platelet count never dropped below 20×10^9 /l in 6 patients, whereas 21 individuals never recovered $>20 \times 10^9$ /l platelets; in the remaining patients, median time to recover $>20 \times 10^9$ /l platelets was 23 days (range 5–70 days). The engraftment rate was 44% (30 of 68 allografts); 38 recipients failed to engraft and either recovered subsequently endogenous hematopoiesis (16 patients) or died (22 patients). Mixed chimerism progressed to full chimerism in 30 grafts. The non-engraftment rate was similar in patients allografted for benign or malignant conditions (56% in both). According to Kaplan and Meier, the median post-transplant OS was 22 months and the 36-month OS was 32% (see Fig. 1). The cumulative incidences of grade II–IV acute GVHD and grade III–IV acute GVHD for

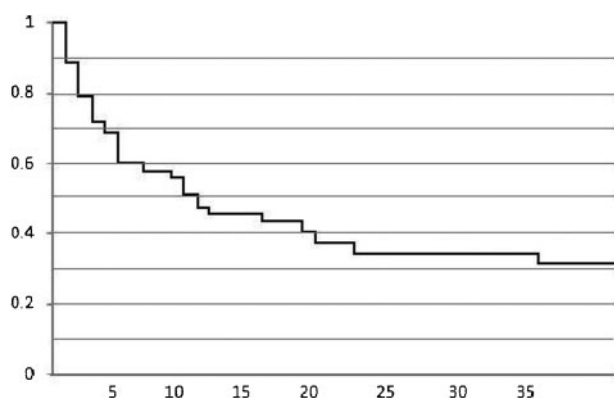


Figure 1 Overall survival according to Kaplan and Meier of the 66 patients allografted with PLB. Time is expressed in months after the allograft.

the entire cohort of patients were 33 and 10% respectively. The OS for patients receiving 6/6 matched cords was significantly better than that of patients receiving other matches (45% at 33 months *versus* 31% at 36 months), *see* Fig. 2. The 36-month OS was better for patients less than 15 year old than those above this age (38 *versus* 19% respectively, $P < 0.01$), *see* Fig. 3. There was no difference in both the engraftment rate and OS between patients who received two cords ($n = 11$) and those who received only one cord. There was no correlation between the number of CD34 cells infused and the engraftment rate or OS; since the median amount of CD34 cells infused in each allograft was 1.25×10^5 CD34 cells/kg, we built curves with the OS of patients receiving above or below this amount of cells, *see* Fig. 4, and the differences are not significant. When comparing the OS of patients allografted with placental hematopoietic stem cells obtained from either domestic or foreign cord blood banks, no difference was recorded according to the log-rank chi-square method.

Discussion

PLB transplantation has extended the availability of allogeneic stem cell transplantation to patients who would not otherwise be eligible for this curative approach because of the lack of an HLA identical stem cell donor;¹⁸ however, there is a concern about graft rejection using this approach given that there are,

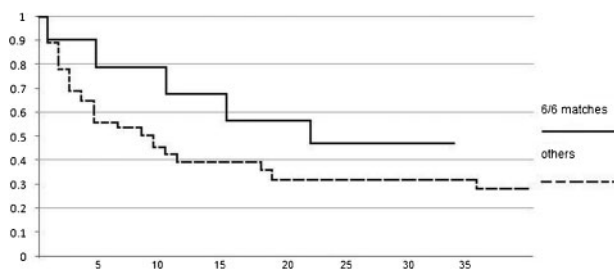


Figure 2 Overall survival according to Kaplan and Meier of the 66 patients according to the HLA matching. The differences are significant. Time is expressed in months after the allograft.

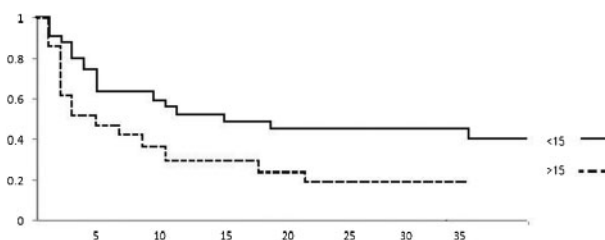


Figure 3 Overall survival according to Kaplan and Meier of the 66 patients according to the age group, expressed in years. The differences are significant. Time is expressed in months after the allograft.

on average, one log fewer cells infused than would be considered for a standard matched sibling or unrelated donor transplant. The RIC preparative methods were proposed initially based on the rationale that the therapeutic benefit of an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is mainly related to the immune-mediated graft *versus* malignancy effect. RIC makes allogeneic transplantation applicable to patients with relative contraindications to conventional myeloablative regimens given its lower rate of transplant-related mortality, with fewer infections and less GVHD.^{13,19,20} Since reduced intensity conditioning is related to fewer and less severe long-term side effects and sequelae, it has also been used to successfully allograft children.^{21,22} In our experience^{19,20} and that of others,²³ RIC is cheaper than conventional allografting. The above mentioned reasons have led us to use RIC allografting as the method of choice for allografting patients in the two centers of this study and several other centers in the country.

The low engraftment rate in the whole group may be related to the fact that most patients (92%) were grafted with non 6/6 matched cords. The engraftment rate was higher (60%) for patients grafted with fully matched cords, in whom the OS was significantly better than those grafted with less compatible cords, *see* Fig. 2. Since the Mexican cord blood banks supplying PLB are only two and considering the high cost of the cord blood units brought into the country from abroad, this experience reflects the fact that patients are allografted

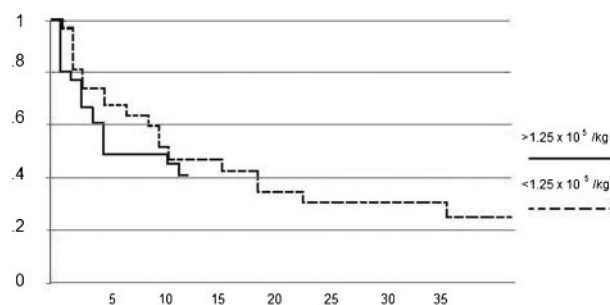


Figure 4 Overall survival according to Kaplan and Meier of the 66 patients according to the amount of CD34 cells infused. The differences are not significant. Time is expressed in months after the allograft.

with less than optimal cord blood units, *itaest*, those which are available despite the fact that they are not good matches. As far as the costs of the cord blood units is concerned, we have informed that the median cost of an PLB unit obtained in the Mexican cord blood banks (Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea in Mexico City or Hospital Universitario de Nuevo León in Monterrey) is 5000.00 USD, whereas the median cost of the PLB units obtained from abroad, either from banks in the US or in Europe is 30 000.00 USD, about six times more expensive.¹⁰ The allografting procedure costs using the 'Mexican' RIC have also been previously published and are around 20 000.00 USD;²⁰ accordingly, the median cost of a PLB graft using the Mexican RIC method and PLB obtained from Mexican banks is higher than that using identical siblings as donors,^{19,20} but lower than that of the haploidentical allografts using our RIC method. RIC allows endogenous recovery of the hematopoiesis, which in turn contributes to a diminished transplant-related mortality of individuals failing to engraft; furthermore the possibility to conduct these allografts on an outpatient basis, with a reduced number of blood products transfusions and reduced requirements of antibiotics and growth factors, makes more affordable this procedure to patients living in developing countries.²⁰

Using the same RIC conditioning regimen to graft hematopoietic stem cells derived from HLA identical siblings, we have found a 5-year OS of around 50%);²⁰ this figure can be compared only with the OS of patients grafted with 6/6 cords; the results of the other group of HLA matches are considerably worse. However, this approach represents another therapeutic option for allografting patients. The low engraftment rate in this experience has to be improved by selecting better cord blood units and additional studies are needed to define if non-myeloablative conditioning is preferable over conventional conditioning in the setting of PLB allografting.

References

- 1 Gluckman E. Ten years of cord blood transplantation: from bench to bedside. *Br J Haematol* 2009;147:192-9.
- 2 Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, 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* 1997;337:373-81.
- 3 Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 1998;339:1565-77.
- 4 Rubinstein P, Stevens CE. Placental blood for bone marrow replacement: The New York Blood Center's program and clinical results. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 2000;13:565-84.
- 5 Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002;100:1611-8.
- 6 Rocha V, Cornish J, Sievers EL, Filipovich A, Locatelli F, Peters C, et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001;97:2962-71.
- 7 González-Llano O, Cárdenas-Serna JM, Rangel-Fuentes M, Mancías-Guerra C, Cantú-Rodríguez OG, Gómez-Almaguer D. El trasplante de precursores hematopoyéticos de la sangre del cordón umbilical en un niño con leucemia linfoblástica. *Medicina Univ* 2002;4:181-4.
- 8 Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Rangel D, Sánchez-Anzaldo J, Ruiz-Argüelles A, Porras-Ramírez G, Luis-López A. Trasplante de células de cordón umbilical: Informe de dos casos. *Medicina Univ* 2002;4:233-5.
- 9 Ruiz-Argüelles GJ, Reyes-Núñez V, Garcés-Eisele J, Warwick RM, McKenna L, Ruiz-Reyes G, et al. Acquired hemoglobin S trait in an adult patient with secondary acute myelogenous leukemia allografted with matched unrelated umbilical cord blood cells using a non-ablative conditioning regimen. *Haema* 2005;8:492-6.
- 10 Mancías-Guerra C, Ruiz-Delgado GJ, Manzano C, Díaz-Hernández MA, Tarín-Arzaga LC, González-Llano O, et al. Umbilical cord blood transplantation using non-myeloablative conditioning: The Mexican experience. *Hematology* 2006;11:355-9.
- 11 Ruiz-Delgado GJ, Mancías-Guerra C, González-Carrillo ML, Ojeda-López Y, Calderón-Garcidueñas ED, Marín-López A, et al. Trasplante alogénico de células hematopoyéticas de dos cordones umbilicales. *Medicina Univ* 2007;9:112-6.
- 12 Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Almaguer D, Morales-Toquero A, Gutiérrez-Aguirre CH, Vela-Ojeda J, García-Ruiz-Esparza MA, et al. The early referral for reduced-intensity stem cell transplantation in patients with Ph1 (+) chronic myelogenous leukemia in chronic phase in the imatinib era: results of the Latin American Cooperative Oncohematology Group (LACOHG) prospective, multicenter study. *Bone Marrow Transplant* 2005;36:1043-7.
- 13 Ruiz-Delgado GJ, Mancías-Guerra C, Tamez-Gómez EL, Rodríguez-Romo LN, López-Otero A, Hernández-Arizpe A, et al. Dimethylsulfoxide (DMSO) induced toxicity in cord blood stem cell transplantation: report of three cases and review of the literature. *Acta Haematol* 2009;122:1-5.
- 14 Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;83:2934-8.
- 15 Ruiz-Argüelles GJ, López-Martínez B, Santellán-Olea MR, Abreu-Díaz G, Resi-Núñez V, Ruiz-Argüelles A, et al. Follow up of hemopoietic chimerism in individuals given allogeneic hemopoietic stem cell allografts using an immunosuppressive, non-myeloablative conditioning regimen: a prospective study in a single institution. *Leukemia Lymph* 2002;43:1509-11.
- 16 Yam P, Petz L, Knowlton R, Wallace R, Stock A, deLange G, et al. Use of DNA restriction fragment length polymorphisms to document marrow engraftment and mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation. *Transplantation* 1987;43:399-407.
- 17 Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Reyes-Núñez V, Pérez-Romano B, Ruiz-Argüelles A, Ramírez-Cisneros F, et al. Assessment of residual disease in acute leukemia by means of polymerase chain reaction: a prospective study in a single institution. *Rev Invest Clin Mex* 2000;52:118-24.
- 18 Majhail NS, Brunstein CG, Tomblin M, Thomas AJ, Miller JS, Arora M, et al. Reduced-intensity allogeneic transplant in patients older than 55 years: unrelated umbilical cord blood is safe and effective for patients without a matched related donor. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:282-9.
- 19 Cantú-Rodríguez OG, Gutiérrez-Aguirre CH, González-Llano O, Mancías-Guerra C, Jaime-Pérez JC, Tarín-Arzaga LC, et al. Outpatient allografting using non-myeloablative conditioning: The Mexican experience. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:119-23.
- 20 Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Almaguer D. Making allogeneic bone marrow transplantation available to patients in developing countries: the Mexican experience. *Open Hematol J* 2008;2:30-6.
- 21 Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles GJ, Tarín-Arzaga LC, González-Llano O, Jaime-Pérez JC, López-Martínez B, et al. Reduced-intensity stem cell transplantation in children and adolescents: the Mexican experience. *Biol Blood Marrow Transpl* 2003;9:157-61.
- 22 Satwani P, Cooper N, Rao K, Veys P, Amrolia P. Reduced intensity conditioning and allogeneic stem cell transplantation in childhood malignant and nonmalignant diseases. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:173-82.
- 23 Saito AM, Zahrieh D, Cutler C, Ho VT, Antin JH, Soiffer RJ, et al. Lower costs associated with hematopoietic cell transplantation using reduced intensity vs high-dose regimens for hematological malignancy. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:209-17.

PUBLICACIÓN 9 - TRADUCCIÓN

Resultados a largo plazo de aloinjertos de sangre placentaria (SP) utilizando un acondicionamiento de intensidad reducida: experiencia multicéntrica en un país en desarrollo.

Ruiz-Delgado GJ, Mancias-Guerra C, Macias-Gallardo J, Gonzalez-Llano O, Hernandez-Arizpe A, Rodriguez-Romo LN, Martinez-Cabriales SA, Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles GJ.

Hematology 2011; 16:155-159.

Resumen

Antecedentes. Recientemente se ha utilizado en mayor medida el trasplante de células hematopoyéticas utilizando sangre placentaria (SP), aún no se ha establecido el mejor régimen de acondicionamiento.

Material y métodos. En un periodo de 8 años, 66 pacientes consecutivos, tanto adultos como niños (40 hombres y 26 mujeres), fueron injertados con células alogénicas de SP utilizando un régimen de acondicionamiento de intensidad reducida: 23 de los pacientes fueron injertados por una enfermedad no maligna y 43 pacientes por una enfermedad maligna. La mediana de edad fue de 7 años (rango 5 meses a 72 años).

Resultados. La mediana de tiempo para obtener una cuenta de granulocitos $>0.5 \times 10^9/L$ fue de 19 días, mientras que la mediana para obtener una cuenta de plaquetas $>20 \times 10^9/L$ fue de 23 días. Treinta y ocho pacientes no lograron prendimiento y no obtuvieron una recuperación hematopoyética endógena o murieron. Se realizó el seguimiento de los pacientes por un período entre 0.5 y 66 meses, con una mediana de 9 meses. La mediana de supervivencia global (SG) post-trasplante fue de 22 meses y la SG a 36 meses fue del 32%, ésta fue significativamente mejor para los individuos que tuvieron una compatibilidad con el cordón de 6/6 (45%). La incidencia acumulada para EICH grado II-IV y III-IV en los pacientes que injertaron fue de 33% y 10 % respectivamente.

Discusión. La baja tasa de prendimiento debe mejorarse con una más adecuada selección de las unidades de sangre de cordón; son necesarios estudios adicionales para definir si el acondicionamiento no mieloablativo es preferible al uso del acondicionamiento convencional.

Introducción

El trasplante de células madre hematopoyéticas de sangre placentaria ha sido explorado recientemente en un número creciente de pacientes. La relativa facilidad de su obtención y el bajo riesgo para desarrollar enfermedad injerto contra huésped (EICH) aguda ha hecho que el trasplante de SP sea una opción atractiva a los trasplantes de células madre hematopoyéticas derivadas de médula ósea [1-7]. Los trasplantes de SP con RAIR amplían el ámbito de los pacientes que pueden beneficiarse con este tipo de tratamientos, incluyendo a los pacientes más viejos o más enfermos que no tienen un donante idéntico.

Material y métodos

Pacientes y SP. Todos los pacientes aloinjertados con SP consecutivamente desde enero del año 2002 en el Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla (Puebla, México) y el Hospital Universitario de Nuevo León (Monterrey, México) fueron incluidos de manera prospectiva en el estudio. A los niños y pacientes adultos con indicación de aloinjerto y carencia de un donante familiar HLA idéntico o compatible les fue propuesto un aloinjerto de SP. Se realizó una búsqueda inicial en los Bancos de sangre de cordón mexicanos, la cual fue seguida de una búsqueda internacional en caso de que no se encontraran unidades compatibles en México, los pacientes fueron injertados si la SP estaba disponible. La tipificación serológica para los loci A y B del HLA se llevó a cabo hasta el año 2003; subsecuentemente un método molecular híbrido fue utilizado para este loci. Los antígenos DR clase II fueron realizados siempre por biología molecular. Los estudios del locus C no fueron practicados en todos los individuos. La SP y la de los receptores necesitaron ser estudiadas en todos los casos para los loci A, B y DR del HLA para poder ser considerada HLA idéntica, la SP fue también HLA compatible con 1-3 disparidades (3/6, 4/6, 5/6 o idéntica 6/6).

Acondicionamiento e Injerto. Para este protocolo, el RAIR Mexicano fue utilizado en todos los casos, se administró [9-13] busulfan por vía oral a 4 mg/Kg en los días -6 y -5; ciclofosfamida intravenosa a 350mg/m² en los días -4, -3 y -2; fludarabina a 30mg/m² en los días -4,-3 y -2; ciclosporina A (CyA) a 5mg/Kg fue iniciada en el día -1, y metotrexato a 5 mg/m² fue administrado los días +1, +3, +5 y +11. La CyA se administró por vía oral hasta el

día +180 con ajustes de acuerdo a los niveles séricos de la CyA, entonces se fue disminuyendo durante 30-60 días. Si se presentaban datos de EICH, entonces la disminución en la dosis de CyA se hacía en un período más largo de tiempo. Las células de la SP se administraron en el día 0 a todos los pacientes de manera ambulatoria.

Quimerismo y estudios de biología molecular. En los casos con diferente sexo entre donador y receptor, se realizó por medio de la técnica de hibridación *in situ* fluorescente la identificación de los cromosomas X e Y [14,15], mientras que estudios de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción en los linfocitos de la sangre periférica [15,16] se practicaron en los otros casos. Los marcadores moleculares de la enfermedad de base fueron detectados mediante múltiples RT-PCR [15,17].

Resultados

Pacientes y SP. Sesenta y seis pacientes niños y adultos, 40 varones y 36 mujeres, fueron injertados con células madre hematopoyéticas alogénicas obtenidas de 79 cordones umbilicales. 26 pacientes fueron injertados por enfermedades no malignas y 43 por enfermedades neoplásicas; dos pacientes recibieron dos injertos consecutivos con sangre de cordón (Tabla). La mediana de edad fue de siete años (rango de 5 meses a 72 años). 36 unidades de SP fueron obtenidas de Bancos de cordón umbilical mexicanos (25 del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea en la ciudad de México y 8 del Hospital Universitario de Nuevo León en Monterrey); siete cordones fueron de hermanos HLA compatibles y los otros 39 fueron obtenidos tanto de los Estados Unidos de América, como de Europa (Tabla I). Hubo 11 compatibilidades 6/6, 30 5/6, 36 4/6 y una 3/6. Se realizaron 57 procedimientos con una sola unidad y once se llevaron a cabo con dos cordones (Tabla I). Los aloinjertos contenían una mediana de 2.2×10^7 células nucleadas por Kg (Rango de $0.006 - 8.5 \times 10^7$ /Kg) y una mediana de 1.25×10^5 células CD34/Kg (Rango $0.01 - 22 \times 10^5$ /Kg).

Prendimiento y supervivencia. Debido a la naturaleza heterogénea del grupo sólo dos variables fueron evaluadas, prendimiento y supervivencia global (SG). Los granulocitos no disminuyeron por debajo de 0.5×10^9 /L en dos pacientes y, en 21 pacientes, no recuperaron una cuenta $>0.5 \times 10^9$ /L; en los otros pacientes, la mediana de tiempo para recuperar un

recuento $>0.5 \times 10^9$ granulocitos fue de 19 días (rango 10-55 días). La cuenta de plaquetas nunca fue $<20 \times 10^9/L$ en seis pacientes, 21 pacientes no lograron recuperar la cifra de plaquetas $>20 \times 10^9/L$; en el resto de los pacientes, la mediana de recuperación de plaquetas $>20 \times 10^9/L$ fue de 23 días (rango 5-70 días).

La tasa de prendimiento del injerto fue del 44% (30 de 68 aloinjertos); 38 pacientes fallaron en injertar y tampoco obtuvieron la subsecuente hematopoyesis endógena (16 pacientes) o murieron (22 pacientes). El quimerismo mixto progresó a quimerismo completo en 30 injertos. La tasa de no prendimiento fue similar en pacientes trasplantados por enfermedades benignas que por condiciones malignas (56% entre ambas). De acuerdo a Kaplan y Meier, la mediana de SG post-trasplante fue de 22 meses y la SG a los 36 meses fue del 32% (ver Fig. 1). Las incidencias acumuladas de EICH aguda grado II-IV y EICH aguda grado III-IV para toda la cohorte de pacientes fueron de 33% y 10%, respectivamente. La SG para los pacientes que recibieron un cordón compatible 6/6 fue significativamente mejor que la de los pacientes que recibieron cordones con otro grado de compatibilidad (45% a 33 meses versus 31% a 36 meses) (ver Fig. 2). La SG a 36 meses fue mejor para los pacientes menores de 15 años de edad cuando se comparó con mayores de esa edad (38% versus 19%, respectivamente, $p < 0.01$) (ver Fig. 3). No hubo diferencia en la tasa de prendimiento y en la SG entre los pacientes que recibieron un cordón y aquellos que recibieron dos cordones.

No hubo correlación entre el número de células CD34 infundidas y la tasa de prendimiento o de SG; la mediana de células CD34 infundidas en cada aloinjerto fue de $1.25 \times 10^5/Kg$, las curvas de SG de los pacientes que recibieron una cantidad mayor o menor de esta cifra (ver Fig. 4) no mostraron diferencias significativas. Cuando comparamos la SG de los pacientes aloinjertados con células madre hematopoyéticas placentarias obtenidas de Bancos de sangre locales o extranjeros, no hubo diferencia entre ellos de acuerdo al método de la chi cuadrado.

Discusión

Los métodos preparatorios con RAIR se basaban en que el beneficio terapéutico de un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas está relacionado, principalmente,

con el mecanismo inmune del efecto del injerto *versus* tumor. Los RAIR permiten aplicar un trasplante alogénico a pacientes con contraindicaciones relativas para los regímenes mieloablativos convencionales, dada la baja tasa de mortalidad relacionada con el trasplante, con menos infecciones y menos EICH [13,19,20].

La baja tasa de prendimiento en el grupo puede estar relacionada con el hecho de que muchos pacientes (92%) fueron trasplantados con cordones que no tenían una compatibilidad 6/6. La tasa de prendimiento fue más alta (60%) para pacientes injertados con cordones idénticos; además, en ellos la SG fue significativamente mejor que la de aquellos injertos con cordones menos compatibles (ver Fig. 2).

En México hay sólo dos Bancos de cordón que abastecen SP y, si se considera el alto coste de las unidades de sangre de cordón traídas al país desde el extranjero, se pone de manifiesto la escasa disponibilidad de unidades –que además no presentan una buena compatibilidad-, por lo que los pacientes son aloinjertados con una cantidad menor a la óptima de unidades de sangre de cordón.

Los RAIR permiten recuperación endógena de la hematopoyesis, lo cual contribuye a la disminución de la mortalidad relacionada con el trasplante en los individuos que fallaron en injertar; además posibilitan llevar a cabo estos aloinjertos de manera ambulatoria, con una reducción en el número de productos sanguíneos transfundidos y también una reducción en los requerimientos de antibióticos y factores de crecimiento, haciendo de esta manera el procedimiento más asequible para los pacientes que viven en países en vías de desarrollo [20].

La baja tasa de prendimiento en esta experiencia tiene que ser superada realizando una mejor selección de las unidades de sangre de cordón. Son necesarios estudios adicionales para definir si los acondicionamientos no mieloablativos son preferibles a los acondicionamientos convencionales en este escenario de aloinjertos de SP.

Feasibility of an outpatient HLA haploidentical stem cell transplantation program in children using a reduced-intensity conditioning regimen and CD3–CD19 depletion

Oscar González-Llano, Laura Nelly Rodríguez-Romo, María del Consuelo Mancías-Guerra, Luz Tarín-Arzaga, José Carlos Jaime-Pérez, José Luis Herrera-Garza, Olga Graciela Cantú-Rodríguez, César Homero Gutiérrez-Aguirre, Ricardo Daniel García-Sepúlveda, Ana Yuritzen García-Marín, Laura Villarreal-Martínez, María del Rosario Salazar-Riojas, David Gómez-Almaguer

Hematology Service, Hospital Universitario 'Dr. Jose E. Gonzalez', Universidad Autónoma de Nuevo Leon, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico

Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation (haplo-HSCT) has been developed as an alternative transplant strategy for children with hematological disorders who do not have an HLA-matched donor. We report the analysis of the outcome for 18 consecutive pediatric patients with various hematological diseases, who underwent haplo-HSCT using a reduced-intensity conditioning regimen and CD3/CD19 depletion in an outpatient setting. Twelve of the 18 patients (66.6%) engrafted either transiently or definitively (9 patients engrafted with full donor chimerism and 3 with mixed chimerism). Six patients with acute lymphoblastic leukemia were disease-free between 2 and 35 months (median 25 months) post-HSCT. The overall survival was 33.3% with a median of 25 months (range 2–35). Our results suggest that haplo-HSCT can be a feasible therapeutic alternative for children who do not have a suitable family donor or available cord blood units. These results also demonstrate that it is possible to perform this regimen on an outpatient basis.

Keywords: Haploidentical, Transplantation, Children, Outpatient

Introduction

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a therapeutic option for patients with leukemia and other hematological and non-hematological diseases.^{1–3} The optimal results have been obtained in patients with a donor matched in the human leucocyte antigen (HLA) loci. Unfortunately, a matched donor is only available in approximately 25% of these patients.^{4,5} HSCT from either a mismatched or haploidentical donor is complicated due to the high rate of graft-versus-host disease (GVHD) and non-engraftment. These risks have been reduced to a level similar to those of matched unrelated donor

transplants by depleting alloreactive T-cells^{6–8} by either T-cell depletion or CD34 selection strategies. Currently, haploidentical transplantation is an alternative approach for virtually all pediatric patients.^{5,7,9–11} Reduced-intensity conditioning (RIC) regimens enable allogeneic HSCT with low toxicity and have been performed entirely in an ambulatory setting.¹² There is very little information regarding the implementation of an HSCT on an outpatient basis, particularly in the pediatric population, but recent data have shown that allogeneic HSCT is feasible in an ambulatory care setting.^{12–14} To our knowledge, there is no information regarding ambulatory haploidentical HSCT; therefore, we decided to evaluate our experience on outpatient haplo-HSCT in children who were in good clinical condition.

Correspondence to: David Gómez-Almaguer, Servicio de Hematología del Hospital Universitario, Universidad Autónoma de Nuevo León, Madero y Gonzalitos s/n, Colonia Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León 64460, Mexico. Email: dr_gomez@infosel.net.mx

Materials and methods

We analyzed data from 18 consecutive patients without an HLA-matched donor requiring HSCT for a hematological disease. These patients received CD3/CD19 depleted grafts from haploidentical family donors from January 2009 to July 2012, at the Hematology Service of the Hospital Universitario 'Dr. Jose Eleuterio Gonzalez' in Monterrey, Mexico.

Patients

The eligibility criteria to determine the application of an ambulatory HSCT were the same as those of other outpatient allografting protocols used in our hospital: a Karnofsky score of at least 70%, a serum creatinine level less than 2 mg/dl, a preserved oral route, residence close to the hospital in a clean facility with telephone access, and the permanent company of any of the parents/guardians throughout treatment. Hemoglobin and platelet values were not used as selection criteria.

Other criteria to determine the suitability for the ambulatory procedure were the availability of an area designated for the exclusive use of the patient within the residence, the appropriate educational level of both the patient and the parents/guardians, and both parties having complete instructions relating to the attention and controls to be observed during the procedure. This approach required extensive involvement of the patient, the family, and the transplant team.¹³ The tutors signed an informed consent for outpatient HSCT, which was approved by our hospital's ethics committee.

Donors, stem cell mobilization, and collection procedure

HLA compatibility was assessed for family members by high-resolution molecular typing methods. The family donors were ranked based on their HLA matching, with a minimum of 5/10 compatible antigens for selection. Cross matching was not part of the protocol at the time. The presence of active viral diseases was ruled out by standard procedures (cytomegalovirus (CMV), human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus).

Subcutaneous granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) was administered to all donors at 10 µg/kg/day for 5 consecutive days to mobilize the bone marrow. Stem cell collection was performed on the fifth day by apheresis using a Cobe Spectra® V6.1 cell separator (Gambro BCT, Hechingen, Germany).

Flow cytometric analysis was performed using a Becton Dickinson® FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) according to the protocol recommended by the International Society for Hematotherapy and Graft Engineering.

Cells measured included CD34+, CD3+, CD19+; NK cells were not quantified.

Cells were stained with CD34 phycoerythrin (PE) class III, CD45 fluorescein isothiocyanate, CD3 allophycocyanin SK7, and 7 amino-actinomycin D, for cell viability, (all from Becton Dickinson®), as well as CD20 PE (Dako®, Dako, Inc., Carpinteria, CA, USA). A minimum of 100,000 events was acquired for all antigens in the leukapheresis product. In the target fraction after depletion, 500,000 events were acquired.¹⁵

CD3/CD19 depletion

The product of the apheresis collection was processed immediately with CliniMACS® plus (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). The cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with ethylenediaminetetraacetic acid and 0.5% human albumin followed by incubation with CliniMACS® anti-CD3 and anti-CD19 antibodies directly conjugated to magnetic microbeads. Following the manufacturer's recommendation one vial of CD3 antibody was used for every 4×10^{10} mononuclear cells (MNC) with up to 15×10^9 CD3+ cells expected to be depleted; one vial of anti-CD19 with a maximum depletion capacity of 5×10^9 CD19+ cells was also used. However, because the depletion of T-cells was not as expected, the dose of anti-CD3 was doubled according to new manufacturer's instructions. The log goal for depletion was 3.0–4.1 for CD3+ and 2.2–3.7 for CD19+. Cells were under continuous agitation for 30 minutes, washed once with CliniMACS® PBS buffer, then resuspended in 150–200 ml buffer solution and processed with the CliniMACS® system employing large set (LS)/tubing set (TS) and depletion tubing set (DTS) separation columns for depletion using the Depletion 3.1 software.¹⁶ LS sets were used initially; however, they were replaced by DTS to shorten processing time.

Conditioning regimen and GVHD prophylaxis

The administration of RIC regimen was ambulatory, with patients receiving chemotherapy at the outpatient clinic and being discharged after the procedure. All patients had an indwelling central venous catheter placed before starting the conditioning regimen. The regimen included 50 mg/m² of intravenous (IV) antithymocyte globulin on days –10 to –7, 500 mg/m² IV cyclophosphamide on days –6 to –3, 40 mg/m² orally (p.o.) fludarabine on days –6 to –3, and 200 mg/m² p.o. melphalan on day –2. Fludarabine and melphalan were administered orally because an intravenous presentation is not available in our country. Specifically with melphalan, the total

number of tablets was ground and mixed with pineapple juice.

Patients received no support with post-transplant G-CSF. GVHD prophylaxis consisted of 3 mg/kg p.o. cyclosporine beginning on day -1, 5 mg/m² of intramuscular methotrexate on days +1, +3, and +6, and the following schedule for prednisone: 2 mg/kg on days -10 to -7, 1 mg/kg on days -6 to +15, and 0.5 mg/kg p.o. on days +16 to +20. Mycophenolate mofetil was added only in the first two patients, at a dose of 600 mg/m² p.o.

All patients received prophylaxis with acyclovir (750 mg/m²/day orally) regardless of the patients' serological status before transplantation, itraconazole (100 mg/day orally), and ciprofloxacin (15 mg/kg orally every 12 hours) until a neutrophil count of at least 1 × 10⁹/l was reached. At this point the first three drugs were suspended, and trimethoprim-sulfamethoxazole, 150 mg/m²/day orally twice per week, was given.

Engraftment and chimerism analyses

Engraftment of neutrophils was defined as a count >0.5 × 10⁹/l and a platelet count >20 × 10⁹/l for 2 consecutive days without platelet transfusion support. Chimerism was evaluated in peripheral blood on days +30 and +180 post-transplant by either fluorescent hybridization if the recipient and donor were sex mismatched or by microsatellite molecular biology if the recipient and donor were sex matched.^{17,18} The levels of chimerism were described as follows: complete donor chimerism, >95% donor cells; mixed chimerism, 10–95%; and no chimerism, <10%. Immune reconstitution was evaluated between 9 and 12 months post-transplant by means of serum immunoglobulins and lymphocyte subpopulations determinations at +90, +120, and +180 days.

Outpatient care and monitoring

During the period between the start of the conditioning regimen and neutrophil engraftment, the patients were examined in the outpatient clinic on a daily basis. No air cleaning system was employed either at the outpatient clinic or at home. Hospital rooms had independent air conditioning systems; it was recommended that patients at their homes stay alone in their room close to the principal caregiver and that food must be prepared there as clean and 'sterile' as possible. The parents/guardians were instructed to report vomiting, diarrhea, bleeding, or any other abnormalities. Temperature was monitored frequently, and if it rose above 38°C, the parents/guardians reported to the transplant team for an infection check-up of the child.

Patient surveillance was performed daily by physicians on the transplant team at the outpatient clinic.

Nurses checked vital signs, and physicians examined the patients for mucositis, herpes, fungi, and acute GVHD (aGVHD) lesions. Blood samples were drawn if necessary. If the hemoglobin level decreased below 7 g/dl, the platelet count was below 20 × 10⁹/l, or clinical signs of bleeding was noticed, the patient was transfused with the respective blood components (which were leukodepleted) as an outpatient. Intravenous immunoglobulin and G-CSF were not required. Hospital beds were kept available for patients who needed to be admitted. If the fluid intake was impaired, the patient was admitted to the hospital. Criteria for hospital admission were the following: deteriorating condition, at least twice readings of body temperature >38.5°C, and/or if the guardian/parents were unable to stay at the patient's home to support him or her.

Statistical analysis

Descriptive statistics such as medians and ranges were used to describe the patient characteristics as well as pre-transplant and post-transplant outcomes, whereas Kaplan–Meier method estimates were used for assessing overall survival (OS; from the day of transplant until either the last check-up or death). All values were generated using IBM SPSS[®] (Chicago, IL, USA) V20.0 for Windows.

Results

Patients

Eighteen children (11 males and 7 females) with various hematological diseases (15 with a malignancy and 3 with non-malignant disease) were included. In relation to HLA compatibility, two patients had 8/10 HLA compatibility, two had 7/10 compatibility, and the remainder had 5/10 compatibility. Seven patients resided in other cities and stayed either a transitional home or with a relative (Table 1).

Donors

Median donor age was 35 years (range 8–59); only 5 of the 18 needed a catheter for apheresis. The procedure was well tolerated by all donors; no severe side effects occurred. The mother was the donor for 14 of the patients, the father for 2 of the patients, and the brother for the remaining 2 patients.

Graft content

All patients received an HSCT with CD3/CD19 depleted haploidentical grafts. The grafts contained a median of 10.8 × 10⁶/kg body weight (range 6.7–18.47 × 10⁶) CD34+ cells and 13.1 × 10⁵/kg body weight (range 3.4–879.7 × 10⁵) CD3 cells. The log of CD3+ depletion was 2.5 ± 0.6 and 3.1 ± 0.9 for CD19+. Table 2 outlines the graft characteristics.

Table 1 Patient characteristics prior to transplantation

Case	Gender	Age (years)	Diagnosis	Donor	HLA compatibility
1	Male	7	ALL in 3 CR	Mother	5/10
2	Female	9	AML in 2 CR	Mother	7/10
3	Male	6	ALL high risk in 1 CR	Mother	5/10
4	Female	11	ALL in 2 CR	Mother	5/10
5	Female	3	Sickle cell disease/thalassemia	Mother	5/10
6	Male	9	ALL in 2 CR	Mother	5/10
7	Female	9	ALL in 3 CR	Mother	5/10
8	Male	2	Sickle cell disease	Mother	8/10
9	Female	3	AML in 2 CR	Mother	5/10
10	Male	9	ALL in 2 CR	Mother	5/10
11	Male	4	AA	Brother	7/10
12	Male	4	AML high risk in 1 CR	Mother	5/10
13	Female	6	ALL in 2 CR	Mother	5/10
14	Male	6	ALL high risk in 1 CR	Father	5/10
15	Female	1	ALL high risk in 1 CR	Mother	5/10
16	Male	13	ALL in 3 CR	Father	5/10
17	Male	15	ALL high risk in 2 CR	Brother	8/10
18	Male	4	ALL in 1 CR	Mother	5/10

ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; AA, aplastic anemia; CR, complete remission

Table 2 Graft characteristics, including median and range

Case	CD34/kg	CD3/kg
1	18.47 × 10 ⁶	57 × 10 ⁵
2	6.99 × 10 ⁶	6 × 10 ⁵
3	12 × 10 ⁶	3.4 × 10 ⁵
4	6.76 × 10 ⁶	8.6 × 10 ⁵
5	8.6 × 10 ⁶	13.5 × 10 ⁵
6	7.7 × 10 ⁶	14.4 × 10 ⁵
7	12 × 10 ⁶	3.4 × 10 ⁵
8	7.8 × 10 ⁶	14.9 × 10 ⁵
9	11.23 × 10 ⁶	21.9 × 10 ⁵
10	15.4 × 10 ⁶	12.44 × 10 ⁵
11	10.6 × 10 ⁶	7.0 × 10 ⁵
12	9 × 10 ⁶	10.7 × 10 ⁵
13	9.3 × 10 ⁶	12.6 × 10 ⁵
14	14.7 × 10 ⁶	12.7 × 10 ⁵
15	11.5 × 10 ⁶	14.3 × 10 ⁵
16	11 × 10 ⁶	27.6 × 10 ⁵
17	12 × 10 ⁶	879.7 × 10 ⁵
18	10.6 × 10 ⁶	14.1 × 10 ⁵
Median	10.8 × 10 ⁶	13.1 × 10 ⁵
Range	6.7 × 10 ⁶ –18.47 × 10 ⁶	3.4 × 10 ⁵ –879.7 × 10 ⁵

Engraftment

Engraftment of neutrophils and platelets was achieved at a median of 14 days (range 9–22) for neutrophils and 13.5 days (range 9–54) for platelets. Five patients with graft failure had autologous recovery of neutrophils at a median of 32 days (range 27–60) and platelets at a median of 15 days (range 14–40). Twelve of the 18 patients (66.6%) engrafted either transiently or definitively, 9 engrafted with full donor chimerism, and 3 with mixed chimerism. Five patients experienced initial graft failure: four with leukemia (two acute lymphoblastic leukemia (ALL) and two acute myeloid leukemia) and one with sickle cell disease. In two patients a back-up of cryopreserved stem cells were administered without response. One patient diagnosed with ALL experienced graft rejection after 3 months; this patient had mixed chimerism.

Follow-up

Four patients had fever during aplasia. They were initially treated with acetaminophen with good response and no further complications. All but two patients were treated entirely on an outpatient basis from the start of the conditioning regimen until the day of engraftment. One patient was admitted to the hospital for 4 days. The patient received broad-spectrum antibiotics, blood and urine cultures were negative. The second patient was admitted because the guardian/parent was unable to stay at home to support the patient during the conditioning regimen. During the first 100 days after HSCT, four other patients required hospitalization for a median of 5 days (range 4–10 days) due to fever and neutropenia.

The regimen was well tolerated with a maximum acute toxicity of grade II mucositis in two patients. Of the four patients who experienced aGVHD ≥ grade II, two responded to oral prednisone (1 mg/kg) and cyclosporine (7.5 mg/kg). In the other two patients, alemtuzumab was administered at 3 mg daily for 5 consecutive days,¹⁹ and both patients achieved a positive initial response. Two patients developed chronic GVHD (cGVHD) (one limited and the other extensive). Table 3 outlines the post-HSCT characteristics of these patients.

Immune reconstitution was evaluated in five cases, all of which achieved it. We were not able to evaluate the remaining transplant recipients due to death or graft failure. Two patients presented CMV reactivation, confirmed by polymerase chain reaction quantitative analysis. One developed pneumonia and colitis, which resolved with 5 mg/kg IV ganciclovir twice daily for 14 days. The other patient presented chronic diarrhea, he was treated with ganciclovir without response and died later during follow-up.

Table 3 Post-transplantation characteristics and current status for 15 patients receiving haplo-HSCT

Case	Day of ANC > 500	Day of PLT > 20,000	Chimerism	aGVHD*	cGVHD**	Status/time post-transplant
1	+20	+17	Full	Skin grade I	No	Alive in remission/35 months
2	+13	+17	Full	Skin grade III	No	Relapsed at 3 months post-transplantation, died/22 months
3	+14	+11	Full	Skin grade I	No	Alive in remission/30 months
4	+22	+20	Full	Skin grade I	No	Died due to lymphoproliferative disease/12 months
5	+13	+54	Mixed	Skin II	Extensive	Died with extensive GVHD/3 months
6	+60	+14	No	No	No	Relapse at 3 months, died/20 months
7	+14	+11	Full	No	No	Alive in remission/28 months
8	+27	+15	No	No	No	GF, died due to GF-fungal sepsis/3 months
9	+32	+32	No	No	No	GF, died due to relapse/3 months
10	+14	+14	Full	Skin grade I and intestine grade II	No	Died due to pneumonia/3 months
11	+11	+13	Full	Skin grade I and Intestine grade III	Limited	Died with limited mild GVHD/10 months
12	+30	+14	No	No	No	GF, relapse died/17 months
13	+14	+14	Mixed	No	No	Rejected graft at 3 months, died/3 months
14	+34	+40	No	No	No	GF, alive in remission/2 months
15	+14	+12	Full	Skin grade I	No	Alive in remission/22 months
16	0	0	No	No	No	GF, relapsed, died/2 months
17	+11	+11	Full	Skin grade I	No	Relapse, died/7 months
18	+9	+9	Mixed	No	No	Alive in remission/6 months

GF, graft failure.

*aGVHD as defined by Consensus criteria.¹⁸

**cGVHD as defined by NIH consensus criteria based on the diagnosis and staging of cGVHD.¹⁹

No Epstein-Barr virus and adenovirus infections were documented in our cohort.

Survival

Transplant-related mortality (TRM) was 33.3% (6 of 18). Three patients died from sepsis related to intensive immunosuppression and moderate to severe GVHD, one of which had presented CMV reactivation as previously described. Another patient died from lymphoproliferative syndrome related to transplantation. The remaining two patients died of sepsis, one due to a

Candida albicans infection with primary graft failure and the other from bacterial sepsis with early rejection. The median time of death was 3 months (range 3–12).

Relapse developed in 6 of the 18 patients, in 4 cases primary graft failure occurred, and the other 2 relapsed despite having achieved complete chimerism. All were multi-treated patients who did not respond to rescue schemes; the median time of death was 12 months (range 2–22) post-HSCT. The OS was 33.3%, with a median of 25 months (range 2–35) post-HSCT (Fig. 1).

Discussion

HSCT is a potentially curative method of treatment for several life-threatening diseases. HLA-matched related donors are the first choice as a source of hematopoietic stem cells; however, only one in four patients have this advantage. Recently, there has been significant progress in the use of alternative sources of hematopoietic stem cells, including matched unrelated donors, umbilical cord blood unrelated units, and, recently, haploidentical family donors.^{20,21} In Mexico, there are insufficient umbilical cord blood unrelated units as well as few adult unrelated volunteer donors; therefore, haplo-HSCT can play an important role in countries with similar characteristics. The lack of HLA-matched related donors and financial constraints are the two primary reasons that explain the reduced number of patients undergoing transplantation in developing countries.^{22–24} Although in developing countries like ours an outpatient-based transplant program is of considerable importance

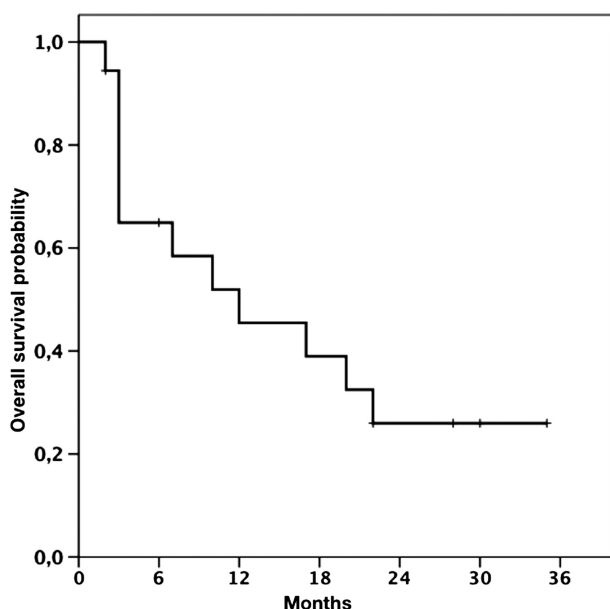


Figure 1 Overall survival for all patients.

due to the associated cost-saving implications, we believe, that this strategy can also be beneficial in developed countries, where transportation, daycare hospitals, and education level of the patients would be simplified leading to more economically sound grafting procedures.

There are two advantages to haplo-HSCT in pediatrics: nearly all patients will have a suitable donor and, in case of an urgent procedure, the wait time is usually short.²⁵ Two of the most significant problems in haplo-HSCT are related to the degree of HLA disparity, which translates into high rates of GVHD and rejection, which are primarily mediated by donor and host T-cells, respectively. Several approaches to address this issue have been published in the practice of haplo-HSCT, with many studies based on the depletion of alloreactive T-cells by different mechanisms: use of anti-CD3-coated microbeads for CD3 depletion, either alone or combined with anti-CD19 *in vitro*, or in conjunction with anti-CD20 (rituximab) depletion of B-cells *in vivo*; also positive selection of CD34 cells along with the administration of a stem cell mega-dose ($>10 \times 10^6$ CD34/kg) has been employed.^{7,10,26,27}

Regarding GVHD, a low rate of severe disease was observed; however, the overall frequency of GVHD was high, most probably due to the high dose of T-cells infused with the graft; this probably was related to an incomplete depletion following the initial recommendations of the manufacturer. This problem was resolved as mentioned, doubling the dose of anti-CD3. We have recently started a second arm in our program of haploidentical transplants depleting only T-cells, so far in three cases the level of depletion reached is similar to that reported by Hangrater *et al.*¹⁰ The low rate of severe GVHD can be related with outpatient management as has been recently suggested by Ringdén *et al.* Home management may reduce secretion of inflammatory cytokines due to a less stressful environment, improve caloric intake, and reduce exposure to hospital flora, all of which have been related to the development of GVHD.²⁸

The high degree in HLA disparity may explain, at least in part, the elevated rejection rate in our group, besides it is possible that the bioavailability of oral administration of melphalan and fludarabine was sub-optimal; therefore, an adequate level of immunosuppression might not have been reached.

Several transplant programs are exploring strategies to reduce the length of the patient's hospital stay by conducting part of the procedure on an outpatient basis. It is clear that this measure results in a better tolerance of the transplant, a significant reduction of nosocomial infections such as *Candida* and *Pseudomonas*, and a decrease in total medical expenses.^{12,29–32}

We have previously published studies focusing on the use of outpatient-based procedures.^{13,14} In a pilot study conducted during 2000, we showed that allogeneic HSCT could be performed safely on an outpatient basis, these transplants were performed totally on an ambulatory setting using a low-intensity preparative regimen. Since then, we have been successfully allografting individuals almost exclusively on an ambulatory setting.¹³ In our budget-restricted situation, as in other developing countries, the cost of conventional transplantation methods using special hospital units and a myeloablative conditioning regimen is still unaffordable for most of our patients. In a Sweden study, including patients treated at home during the pancytopenic phase, after allogeneic HSCT interesting results were found: on multivariate analysis, the home care patients were discharged earlier, had less GVHD, fewer days on total parenteral nutrition, lower TRM (13 vs. 44%, $P = 0.002$), and lower costs compared with controls treated in the hospital.³³ We believe that outpatient haplo-HSCT is safe and effective for children who are in suitable physical condition. Sixteen out of the 18 transplantation procedures were performed on an outpatient basis from the time the conditioning regimen was implemented to engraftment day. During the first 100 days, only 4 of the 14 cases required hospitalization, all due to fever and neutropenia. It is important to note that the outpatient approach is optimal only for asymptomatic, fully active children whose parents have the capacity to take care of them.

RIC regimens, originally designed for debilitated and elderly patients who have a low tolerance to high doses of chemotherapy^{34,35} represent an effective strategy to reduce toxicity, especially in the long term.^{3,36–39} This approach has proven to be useful in children.^{3,40–42} It appears to be reasonable to assume that pediatric patients receiving a haplo-HSCT could benefit from such advantages.

Evidence has shown decreased TRM with the use of RIC, which enhances T-cell recovery.⁷ It is important to mention that our conditioning regimen does not include total body irradiation, which may also aid in recovery.⁹ Manipulated HSCT from mismatched related donors has gained ample acceptance in the treatment of children with leukemia and other non-neoplastic disorders.⁷ Recently, it has been shown that engraftment is achievable after a RIC regimen using highly immune-suppressive drugs rather than myeloablative agents to overcome the HLA barrier. Our rates of engraftment were similar to those reported by other authors with the use of several conditioning regimens and different methods of selection and/or depletion. With respect to GVHD, the risk of acute and chronic subtypes is similar to that observed in patients who received a transplant from a matched

unrelated donor. In our analysis, we found that cells expressing CD34 and/or CD3 had no influence on the incidence of GVHD.⁵ Although a viral etiology (CMV) was demonstrated in only one case of six deaths related to the procedure, strict monitoring for viral diseases is being continued in every patient; there was one death due to GVHD and three were a consequence of sepsis in the setting of prolonged neutropenia, a consequence due to graft failure and leukemic activity. A high rate of graft failure is our principal problem, which in turn leads to a high TRM; we are confident that the already mentioned T-cell depletion strategy implemented in our subsequent patients will help to significantly reduce the problem of graft failure.

In conclusion, our data suggest that it is safe to practice outpatient haplo-HSCT in children who lack a fully matched donor or have no available cord blood units.

References

- Kojima S, Inaba J, Yoshimi A, Takahashi Y, Watanabe N, Kudo K, *et al*. Unrelated donor marrow transplantation in children with severe aplastic anaemia using cyclophosphamide, anti-thymocyte globulin and total body irradiation. *Br J Haematol*. 2001;114:706–11.
- Palma J, Salas L, Carrion F, Sotomayor C, Catalan P, Paris C, *et al*. Haploidentical stem cell transplantation for children with high-risk leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;59:895–901.
- Llano OG, Perez JC, Rodriguez OC, Guerra CM, Aguirre HG, Garza JL, *et al*. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using a reduced-intensity conditioning regimen in infants: experience at a single institution in Mexico. *Pediatr Hematol Oncol*. 2008;25:39–47.
- Chen XH, Gao L, Zhang X, Zhang C, Kong PY, Liu H, *et al*. HLA-haploidentical blood and bone marrow transplantation with anti-thymocyte globulin: long-term comparison with HLA-identical sibling transplantation. *Blood Cells Mol Dis*. 2009;43:98–104.
- Hough R, Cooper N, Veys P. Allogeneic haemopoietic stem cell transplantation in children: what alternative donor should we choose when no matched sibling is available? *Br J Haematol*. 2009;147:593–613.
- Henslee-Downey PJ. Allogeneic transplantation across major HLA barriers. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001;14:741–54.
- Lang P, Handgretinger R. Haploidentical SCT in children: an update and future perspectives. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42(Suppl 2):S54–9.
- Rowe JM, Lazarus HM. Genetically haploidentical stem cell transplantation for acute leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2001;27:669–76.
- Chen X, Hale GA, Barfield R, Benaim E, Leung WH, Knowles J, *et al*. Rapid immune reconstitution after a reduced-intensity conditioning regimen and a CD3-depleted haploidentical stem cell graft for paediatric refractory haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2006;135:524–32.
- Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P, Schumm M, Neu S, Geiselhart A, *et al*. Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant*. 2001;27:777–83.
- Lang P, Schumm M, Greil J, Bader P, Klingebiel T, Muller I, *et al*. A comparison between three graft manipulation methods for haploidentical stem cell transplantation in pediatric patients: preliminary results of a pilot study. *Klin Padiatr*. 2005;217:334–8.
- Solomon SR, Matthews RH, Barreras AM, Bashey A, Manion KL, McNatt K, *et al*. Outpatient myeloablative allo-SCT: a comprehensive approach yields decreased hospital utilization and low TRM. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45:468–75.
- Cantu-Rodriguez OG, Jaime-Perez JC, Gutierrez-Aguirre CH, Gonzalez-Llano O, Mancias-Guerra C, Tarin-Arzaga LC, *et al*. Outpatient allografting using non-myeloablative conditioning: the Mexican experience. *Bone Marrow Transplant*. 2007;40:119–23.
- Cantu-Rodriguez OG, Gutierrez-Aguirre CH, Jaime-Perez JC, Trevino Montemayor OR, Martinez-Cabriales SA, Gomez-Pena A, *et al*. Low incidence and severity of graft-versus-host disease after outpatient allogeneic peripheral blood stem cell transplantation employing a reduced-intensity conditioning. *Eur J Haematol*. 2011;87:521–30.
- Leuner S, Arland M, Kahl C, Jentsch-Ullrich K, Franke A, Hoffkes HG. Enumeration of CD34-positive hematopoietic progenitor cells by flow cytometry: comparison of a volumetric assay and the ISHAGE gating strategy. *Bone Marrow Transplant*. 1998;22:699–706.
- Instructions for use for the CliniMac Miltenyi Biotec GmbH Germany Issued: January 2010.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:2934–8.
- Yam PY, Petz LD, Knowlton RG, Wallace RB, Stock AD, de Lange G, *et al*. Use of DNA restriction fragment length polymorphisms to document marrow engraftment and mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation. *Transplantation* 1987;43:399–407.
- Gomez-Almaguer D, Ruiz-Arguelles GJ, del Carmen, Tarin-Arzaga L, Gonzalez-Llano O, Gutierrez-Aguirre H, Cantu-Rodriguez O, *et al*. Alemtuzumab for the treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14:10–15.
- Veys P, Amrolia P, Rao K. The role of haploidentical stem cell transplantation in the management of children with haematological disorders. *Br J Haematol*. 2003;123:193–206.
- Lanino E, Sacchi N, Peters C, Giardino S, Rocha V, Dini G, *et al*. Strategies of the donor search for children with second CR ALL lacking a matched sibling donor. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41(Suppl 2):S75–9.
- Bennett C, Waters T, Stinson T, Almagor O, Pavletic Z, Tarantolo S, *et al*. Valuing clinical strategies early in development: a cost analysis of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1999;24:555–60.
- Gomez-Almaguer D. The simplification of the SCT procedures in developing countries has resulted in cost-lowering and availability to more patients. *Int J Hematol*. 2002;76(Suppl 1):380–2.
- Murphy EA, Ferguson SS, Omondi NA, Getzender LC, Gajewski JL, Goldstein GA, *et al*. The National Marrow Donor Program's symposium on patient advocacy in cellular transplantation therapy: addressing barriers to hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16:147–56.
- Spitzer TR. Haploidentical stem cell transplantation: the always present but overlooked donor. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005;2005:390–5.
- Ortin M, Raj R, Kinning E, Williams M, Darbyshire PJ. Partially matched related donor peripheral blood progenitor cell transplantation in paediatric patients adding fludarabine and anti-lymphocyte gamma-globulin. *Bone Marrow Transplant*. 2002;30:359–66.
- Reisner Y, Martelli MF. Tolerance induction by 'megadose' transplants of CD34+ stem cells: a new option for leukemia patients without an HLA-matched donor. *Curr Opin Immunol*. 2000;12:536–41.
- Ringdén O, Remberger M, Holmberg K, Edeskog C, Wikström M, Eriksson B, *et al*. Many days at home during neutropenia after hematopoietic stem cell transplantation correlates with low incidence of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19:314–20.
- Gomez-Almaguer D, Ruiz-Arguelles GJ, Ruiz-Arguelles A, Gonzalez-Llano O, Cantu OE, Hernandez NE. Hematopoietic stem cell allografts using a non-myeloablative conditioning regimen can be safely performed on an outpatient basis: report of four cases. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25:131–3.
- Ruiz-Arguelles GJ, Gomez-Almaguer D, Ruiz-Arguelles A, Gonzalez-Llano O, Cantu OG, Jaime-Perez JC. Results of an outpatient-based stem cell allotransplant program using non-myeloablative conditioning regimens. *Am J Hematol*. 2001;66:241–4.
- Subira M, Sureda A, Ancin I, Martino R, Altes A, Brunet S, *et al*. Allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning is potentially feasible as an outpatient procedure. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32:869–72.

- 32 Parsons SK, Pennarola BW. The plurality of payers' perspectives on hematopoietic stem cell transplantation. *Hematology*. 2012; 17(Suppl 1):S202-7.
- 33 Svahn B, Ringden O, Remberger M. Long-term follow-up of patients treated at home during the pancytopenic phase after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2005;36:511-6.
- 34 Giralt S, Estey E, Albitar M, van Besien K, Rondon G, Anderlini P, *et al*. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 1997;89:4531-6.
- 35 Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, *et al*. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood*. 1998;91:756-63.
- 36 Brodsky RA, Luznik L, Bolanos-Meade J, Leffell MS, Jones RJ, Fuchs EJ. Reduced intensity HLA-haploidentical BMT with post transplantation cyclophosphamide in nonmalignant hematologic diseases. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42:523-7.
- 37 Jacobsohn DA, Duerst R, Tse W, Kletzel M. Reduced intensity haemopoietic stem-cell transplantation for treatment of non-malignant diseases in children. *Lancet*. 2004;364:156-62.
- 38 Del Toro G, Satwani P, Harrison L, Cheung YK, Brigid Bradley M, George D, *et al*. A pilot study of reduced intensity conditioning and allogeneic stem cell transplantation from unrelated cord blood and matched family donors in children and adolescent recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33:613-22.
- 39 Gomez-Almaguer D, Ruiz-Arguelles GJ, Tarin-Arzaga Ldel C, Gonzalez-Llano O, Jaime-Perez JC, Lopez-Martinez B, *et al*. Reduced-intensity stem cell transplantation in children and adolescents: the Mexican experience. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003;9:157-61.
- 40 Jubert C, Wall DA, Grimley M, Champagne MA, Duval M. Engraftment of unrelated cord blood after reduced-intensity conditioning regimen in children with refractory neuroblastoma: a feasibility trial. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46:232-7.
- 41 Gonzalez-Vicent M, Perez A, Abad L, Sevilla J, Ramirez M, Diaz MA. Graft manipulation and reduced-intensity conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from mismatched unrelated and mismatched/haploidentical related donors in pediatric leukemia patients. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2010;32:e85-90.
- 42 Pulsipher MA, Boucher KM, Wall D, Frangoul H, Duval M, Goyal RK, *et al*. Reduced-intensity allogeneic transplantation in pediatric patients ineligible for myeloablative therapy: results of the Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium Study ONC0313. *Blood*. 2009;114:1429-36.

PUBLICACIÓN 10 – TRADUCCIÓN

Viabilidad de un programa de trasplante haploidéntico ambulatorio en niños con un régimen de acondicionamiento de intensidad reducida y retirada de CD3 – CD19.

González-Llano O, Rodríguez-Romo LN, Mancías-Guerra MC, Tarín-Arzaga L, Jaime-Pérez JC, Herrera-Garza JL, Graciela Cantú-Rodríguez O, Gutiérrez-Aguirre CH, García-Sepúlveda RD, García-Marín AY, Villarreal-Martínez L, Salazar-Riojas MR, Gómez-Almaguer D.

Hematology 2014;19:10-17.

El trasplante de células hematopoyéticas haploidéntico (TCH-haplo) se ha desarrollado como una estrategia alternativa de trasplante para niños con enfermedades hematológicas que no cuenten con un donante HLA compatible. Describimos los resultados de un análisis de 18 pacientes pediátricos consecutivos con diversas enfermedades hematológicas, que se sometieron a un TCH-haplo utilizando un régimen de intensidad reducida y depleción de CD3/CD19 de manera ambulatoria. En 12 de los 18 pacientes (66.6%) el injerto progresó, de forma transitoria o definitiva (9 pacientes tuvieron injerto con quimerismo completo y 3 con un quimerismo mixto). Seis pacientes con leucemia linfoblástica aguda estuvieron libres de enfermedad entre 2 y 35 meses (mediana de 25 meses) después del trasplante. La tasa de supervivencia fue del 33.3% con una mediana de 25 meses (rango 2-35). Nuestros resultados sugieren que el TCH-haplo puede ser una buena opción terapéutica para los niños que no cuenten con un donante familiar compatible o con unidades de cordón umbilical disponibles. Estos resultados también demuestran que es posible realizar este procedimiento de manera ambulatoria.

Introducción

Desafortunadamente, sólo el 25% de los pacientes disponen de un donante compatible [4,5]. El TCH con donantes con una disparidad en el HLA o con donantes haploidénticos es complicado debido a las altas tasas de enfermedad de injerto contra huésped (EICH) y de fracaso del injerto. Los riesgos se han reducido a un nivel similar para aquellos trasplantes de donantes compatibles no emparentados agotando los linfocitos T aloreactivos del injerto, ya sea por reducción directa de estas células o por selección de las CD34+.

Los TCH con regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida brindan una baja toxicidad y se han realizado de manera totalmente ambulatoria [12]. Existe muy poca

información acerca de los TCH ambulatorios, particularmente en la población pediátrica, pero informes recientes muestran que son factibles [12-14]. Carecemos de información sobre los TCH-haplo llevados a cabo de manera ambulatoria, por lo que decidimos evaluar nuestra experiencia en pacientes pediátricos ambulatorios que se sometían a un TCH-haplo. Los pacientes debían presentar buenas condiciones clínicas.

Material y Métodos

Analizamos la información de 18 pacientes consecutivos que no contaran con un donante HLA idéntico y que requirieran un TCH para alguna enfermedad hematológica. Estos pacientes recibieron un injerto de donantes familiares haploidénticos, vaciado de células CD3/CD19, entre enero de 2009 y julio de 2012 en el Hospital Universitario José Eleuterio González en Monterrey, México.

Pacientes

Los criterios de selección para el trasplante ambulatorio fueron los mismos que hemos utilizado para nuestros pacientes ambulatorios de otros protocolos en nuestro hospital: puntuación en la escala de Karnofsky de al menos 70%, creatinina sérica menor de 2mg/dl, vía oral preservada, residentes cerca de nuestro hospital y posibilidad de ser acompañados por sus padres a lo largo del procedimiento.

Otros criterios para determinar la posibilidad del trasplante ambulatorio fueron la disponibilidad en casa de un área de uso exclusivo para el paciente, y una apropiada educación de paciente y cuidadores, de forma que tuvieran las instrucciones completas para estar atentos e informar de cualquier dificultad durante el procedimiento.

Donantes, movilización de células madre y proceso de recolección. La compatibilidad en el HLA para los miembros de la familia se realizó por métodos moleculares de alta resolución. Los donantes familiares se seleccionaron basándose en la compatibilidad del HLA, con un mínimo de antígenos de 5/10. La presencia de enfermedades virales se descartó mediante procedimientos estándar (citomegalovirus (CMV), VIH, hepatitis B y hepatitis C).

Todos los donantes recibieron por vía subcutánea una dosis de 10 µg/kg/día de factor estimulante de colonias granulocíticas (FEC-G), durante cinco días consecutivos.

Las células incluidas en la medición fueron CD34+, CD3+, CD19+; las células NK no fueron cuantificadas.

Retirada de CD3/CD19. El producto se procesó de manera inmediata en CliniMACS plus (Miltenyi Biotec GmbH, Bergish Gladbach, Alemania). Las células se lavaron en dos ocasiones con amortiguador salino fosfato (PBS) suplementado con ácido etilendiaminotetraacético y albúmina humana al 0.5%, seguido por la incubación en CliniMACs con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD19 directamente adheridos a micro-perlas magnéticas. Siguiendo las recomendaciones del fabricante, se utilizó un frasco de anticuerpo CD3 por cada 4×10^{10} células mononucleares (CMN), esperando alcanzar un vaciado de 15×10^9 células CD3+; un frasco de anti-CD19 con una capacidad de vaciado máxima de 5×10^9 células CD19+. En vista de que la reducción de células T no fue la esperada, la dosis de anti-CD3 fue duplicada, según instrucciones del fabricante. La meta logarítmica de reducción fue de 3.0 - 4.1 para CD3+ y 2.2 - 3.7 para CD19+. Las células se mantuvieron en constante agitación durante 30 min, se lavaron una sola vez con buffer PBS CliniMACS, después se suspendieron en 150-200 ml de solución amortiguadora y se procesaron con el sistema CliniMACS empleando un conjunto grande de tubos y un conjunto de tubos de vaciado y columnas de separación para reducción utilizando el programa *Depletion 3.1* [16].

Régimen de acondicionamiento y profilaxis de la EICH. La administración del RAIR se realizó de manera ambulatoria, los pacientes recibieron quimioterapia en la clínica y se dieron de alta después del procedimiento. Todos los pacientes tenían un catéter venoso central que se les colocó de manera previa a la administración del régimen de acondicionamiento. El régimen incluyó la administración de 50mg/m^2 de globulina antitimocito por vía intravenosa en los días -10 a -7, 500mg/m^2 de ciclofosfamida por vía intravenosa en los días -6 a -3, 40mg/m^2 de fludarabina por vía oral en los días -6 a -3, y 200mg/m^2 de melfalan por vía oral en el día -2. La fludarabina y el melfalan se administraron por vía oral debido a que la presentación intravenosa no se encuentra disponible en nuestro país. Las tabletas del melfalan se molieron y mezclaron con jugo de piña.

Los pacientes no recibieron FEC-G. La profilaxis para EICH consistió en ciclosporina a 3 mg/kg/día por vía oral iniciando en el día -1, metotrexato por vía intramuscular a 5mg/m² en el día +1, +3 y +6 y prednisona, para la que se empleó el siguiente esquema: 2mg/kg en los días -10 a -7, 1mg/kg en los días -6 a +15, y 0.5mg/kg en los días +16 a +20, siempre por vía oral. Micofenolato de mofetilo se agregó solo en los primeros 2 pacientes a una dosis de 600mg/m² por vía oral.

Análisis del prendimiento y quimerismo. El prendimiento se definió al presentar un recuento de neutrófilos $>0.5 \times 10^9/L$ y un recuento plaquetario $>20 \times 10^9/L$ durante dos días consecutivos y sin requerimiento de transfusión de plaquetas. El quimerismo fue evaluado en sangre periférica a los días +30 y +180 después del trasplante, ya sea por hibridación *in situ* fluorescente -cuando receptor y donante no eran del mismo sexo-, o por microsatélites -si receptor y donante eran del mismo sexo [17,18]. Los niveles de quimerismo fueron clasificados de la siguiente manera: quimerismo completo cuando más del 95% de las células eran del donante; quimerismo mixto si estaban entre el 10% y el-95%, y sin quimerismo cuando eran menores del 10%.

Monitorización y cuidados ambulatorios. Se les indicó a los padres/cuidadores que informaran de cualquiera de los siguientes síntomas: vómitos, diarrea, sangrado o cualquier otra anomalía. La temperatura tenía que ser controlada frecuentemente y, si era superior a 38°C tenían que avisar de inmediato al equipo de trasplante para revisar al niño buscando algún dato de infección.

La vigilancia del paciente se realizaba diariamente por los médicos del equipo de trasplante dentro de la clínica ambulatoria. Las enfermeras revisaban los signos vitales y los médicos buscaban datos de mucositis, herpes, hongos y lesiones de EICH aguda. Se obtenían muestras sanguíneas si era necesario. Cuando los niveles de hemoglobina disminuían a menos de 7g/dl, la cuenta plaquetaria era menor de $20 \times 10^9/L$, o existían datos de sangrado, el paciente era trasfundido de forma ambulatoria con el producto sanguíneo correspondiente vaciado de leucocitos.

Si el paciente no podía tomar líquidos era admitido en el hospital de manera inmediata. Los otros criterios de admisión eran: deterioro de la condición del paciente, que al menos en dos mediciones la temperatura fuera $>38.5^{\circ}\text{C}$ y/o que el padre/cuidador no pudiera quedarse en casa para apoyar al paciente.

Análisis Estadístico. Se utilizaron las medianas y los rangos para describir las características de los pacientes y los resultados previos, tanto pre- como post-trasplante. Se empleó el método de Kaplan-Meier para estimar la supervivencia global (SG: desde el día del trasplante hasta la última revisión o muerte). Todos los datos se obtuvieron utilizando el programa IBM SPSS (Chicago, IL, USA) V20.0 para Windows.

Resultados

Pacientes. Se incluyeron 18 pacientes (11 hombres y 7 mujeres) con distintas enfermedades hematológicas (15 malignas y 3 no malignas). En relación con la compatibilidad en el HLA, dos de los pacientes tuvieron 8/10 de compatibilidad en el HLA, dos más tuvieron compatibilidad 7/10, mientras que el resto fue 5/10. Siete pacientes provenían de otras ciudades y se quedaron hospedados en una casa de transición o en casa de familiares.

Donantes. La mediana de edad de los donantes fue de 35 años (rango de 8-59); solo 5 de los 18 necesitaron un catéter para realizar la aféresis. El procedimiento fue bien tolerado por todos los donantes; no tuvieron ningún efecto adverso serio. En 14 de los pacientes la madre fue la donante, en dos más fue el padre, y en los dos restantes la donación fue por parte de un hermano.

Contenido del Injerto. Todos los pacientes recibieron un TCH con injertos haploidénticos vaciados de CD3/CD19. El contenido de los injertos tenía una mediana de células CD34+ de $10.8 \times 10^6/\text{kg}$ de peso del paciente (rango 6.7 - 18.47×10^6), y células CD3 de $13.1 \times 10^5/\text{kg}$ de peso del paciente (rango 3.4 - 879.7×10^5). El logaritmo de reducción de CD3+ fue de 2.5 ± 0.6 y para CD19+ 3.1 ± 0.9 . En la tabla 2 se describen las características del injerto.

Prendimiento. El prendimiento para neutrófilos se obtuvo con una mediana de 14 días (rango 9-22) y para plaquetas con una mediana de 13.5 días (rango 9-54). Cinco de los pacientes con fracaso de injerto recuperaron de manera autóloga neutrófilos, con una mediana de 32 días (rango 27-60), y plaquetas, con una mediana de 15 días (rango de 14-40). 12 de los 18 (66.6%) injertaron ya sea de manera transitoria o de manera permanente, nueve alcanzaron un quimerismo completo, tres un quimerismo mixto. Cinco pacientes tuvieron un fracaso primario de injerto: cuatro con leucemia (dos con leucemia linfoblástica aguda (LLA) y dos con leucemia mieloide aguda (LMA)) y uno más con anemia de células falciformes.

A dos pacientes se les administró como respaldo células hematopoyéticas criopreservadas sin obtener respuesta. Uno de los pacientes con diagnóstico de LLA presentó rechazo del injerto después de tres meses; este paciente había tenido quimerismo mixto.

Seguimiento. Cuatro de los pacientes presentaron fiebre durante la aplasia. Al principio se les trató con acetaminofén, presentando buena respuesta y sin complicaciones posteriores. Todos los pacientes, excepto dos, fueron tratados de manera ambulatoria desde el inicio del régimen de acondicionamiento hasta el momento en que obtuvieron prendimiento. Durante los primeros 100 días después del TCH cuatro de los pacientes necesitaron hospitalización durante una mediana de 5 días (rango de 4-10 días) debido a fiebre y neutropenia. El régimen fue bien tolerado, con mucositis grado 2 como toxicidad máxima.

De los cuatro pacientes que desarrollaron EICH aguda grado II-IV, dos respondieron a prednisona oral (1mg/kg) y ciclosporina (7.5mg/kg). A los otros dos pacientes se les administró alemtuzumab, 3mg diarios durante cinco días consecutivos [19], y ambos obtuvieron una respuesta inicial positiva. Dos pacientes desarrollaron EICH crónica (una fue limitada y otra extensa). La tabla 3 señala las características post-TCH de estos pacientes.

La reconstitución inmune se evaluó en cinco casos, todos la obtuvieron. No evaluamos a los otros pacientes por muerte o fracaso del injerto.

Supervivencia. La mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) fue de 33.3% (6 de 18). Tres de los pacientes murieron de sepsis por una intensa inmunosupresión y EICH moderada o grave, uno de los cuales presentó reactivación de CMV, como se describió con anterioridad. Otro paciente murió por síndrome linfoproliferativo relacionado con el trasplante. Los dos pacientes restantes murieron de sepsis, uno por infección por *Candida albicans* con fracaso primario del injerto y otro por sepsis bacteriana con rechazo temprano. La mediana de tiempo de muerte fue 3 meses (rango de 3-12).

La recaída se presentó en seis de los 18 pacientes, en cuatro de los cuales ocurrió fracaso primario del injerto y, en los otros 2, la recaída ocurrió a pesar de haber alcanzado quimerismo completo.

Todos los pacientes eran multitratados y no respondieron a esquemas de rescate, la mediana de tiempo para la muerte fue 12 meses (rango 2-22) después del trasplante. La SG fue del 33.3% con una mediana de 25 meses (rango 2-35 meses) después del trasplante.

Discusión

Recientemente ha habido progresos significativos con la utilización de fuentes alternativas de células hematopoyéticas, incluyendo donantes compatibles no emparentados, unidades de sangre de cordón umbilical no relacionadas y, finalmente, donantes familiares haploidénticos [20,21]. En México son insuficientes las unidades de sangre de cordón umbilical, así como el reducido número de donantes voluntarios adultos de médula ósea. Por ello, el TCH-haplo puede desempeñar un papel muy importante en países con características similares.

Existen dos ventajas del TCH-haplo en pediatría: prácticamente todos los pacientes tendrán un donante y, en procedimientos de urgencia, el tiempo de espera suele ser corto [25]. Dos de los principales problemas del TCH-haplo están principalmente relacionados con la disparidad en el HLA, que da lugar a altas tasas de ECH y fracasos del injerto, mediados primariamente por los linfocitos T del donante y del paciente, respectivamente. Se han publicado diferentes enfoques para resolver esta problemática en los TCH-haplo, la mayoría se basan en distintos mecanismos para retirar las células T alo reactivas: el uso de micro-

perlas unidas al anticuerpo anti-CD3 para capturar células CD3, solo o combinado con anti-CD19 *in vitro*, o también junto con anti-CD20 (rituximab) para capturar células B *in-vivo*; también se ha utilizado como método la selección de células CD34, con la administración de una mega dosis de células hematopoyéticas ($>10 \times 10^6$ de CD34/kg) [7,10,26,27].

En nuestros pacientes, hemos observado una tasa baja de EICH grave; no obstante, la frecuencia de presentación de EICH ha sido alta, muy probablemente debido a las cuentas elevadas de células T que se infundieron en el injerto, y que posiblemente se relacione con su retirada incompleta al seguir las instrucciones iniciales del fabricante. Este problema se resolvió, como se mencionó anteriormente, duplicando la dosis de anti CD3. Ya hemos iniciado un segundo brazo en nuestro programa de trasplantes haploidénticos con retirada solamente de células T; hasta el momento, en los tres casos el nivel de vaciado alcanzado fue similar al publicado por Hangrater *et al.*, [10]. La baja tasa de EICH grave podría estar relacionada con el manejo ambulatorio, como sugieren Ringdén *et al.* El cuidado en casa puede reducir la secreción de citoquinas inflamatorias, ser un ambiente menos estresante, mejorar la ingesta calórica y reducir la exposición a la flora hospitalaria, motivos todos relacionados con el desarrollo de la EICH [28].

El alto grado de diferencia en los HLA puede explicar, al menos en parte, la elevada tasa de rechazo en nuestro grupo; además, la administración oral de melfalan y fludarabina puede ocasionar que su biodisponibilidad no sea la óptima; por lo tanto, es posible que no se haya obtenido un adecuado nivel de inmunosupresión.

En nuestra situación de presupuesto restringido, como en la que se encuentran otros países en desarrollo, el coste de un trasplante convencional, utilizando unidades hospitalarias especiales y un régimen de acondicionamiento mieloablativo, es todavía inaccesible para la mayoría de nuestros pacientes.

En un estudio sueco, que incluía pacientes tratados en casa en la etapa de pancitopenia después de un trasplante alogénico, se observaron resultados interesantes: el análisis multivariante mostró que los pacientes tratados en casa eran dados de alta más rápidamente, tenían menos EICH, menos días con nutrición parenteral, menor TRM (13 vs

44%, $P=0.002$) y menor coste, en comparación con los pacientes atendidos en el hospital [33]. Pensamos que el TCH-haplo es seguro y efectivo realizarlo de manera ambulatoria en niños que se encuentren en condiciones físicas apropiadas. 16 de los 18 procedimientos de trasplante se realizaron de manera totalmente ambulatoria, desde el día de inicio del régimen de acondicionamiento hasta el día del prendimiento.

Los RAIR, que originalmente se diseñaron para pacientes debilitados y de edad avanzada y que tenían poca tolerancia a las dosis altas de quimioterapia [34,35], representan una estrategia efectiva para reducir la toxicidad, especialmente la de largo plazo [3,36-39]. Este sistema resultó ser efectivo también en niños [3,40-42]. Parece razonable asumir que los pacientes pediátricos que reciben un TCH-haplo se pueden ver beneficiados por sus ventajas.

La evidencia ha demostrado una disminución en la MRT con el uso de RAIR que produce una recuperación de las células T [7]. Es importante mencionar que nuestro régimen de acondicionamiento no incluye radiación corporal total, lo que puede beneficiar también la recuperación [9].

Nuestra tasa de prendimiento fue similar a las descritas por otros autores que utilizaron diferentes regímenes de acondicionamiento y diferentes métodos de selección y/o reducción. Con respecto a la EICH, el riesgo de padecerla de manera aguda o crónica es parecido al que se ha visto en pacientes que recibieron un trasplante de un donante compatible no relacionado. En nuestro análisis, hemos observado que las células que expresan CD34 y/o CD3 no tienen influencia en la incidencia de EICH [5]. Nuestro problema principal fue la alta tasa de fracaso del injerto, que nos condujo a una MRT elevada. Estamos seguros de que la nueva estrategia de retirada, ya mencionada, para nuestros subsecuentes pacientes, nos ayudará a reducir el problema del fracaso del injerto.

Nuestros datos sugieren que la realización ambulatoria de los TCH-haplo en niños que carecen de un donante idéntico y que carecen también de una unidad de sangre de cordón umbilical es segura.

DISCUSIÓN

Cada año se realizan aproximadamente cuatro mil trasplantes alogénicos en niños en todo el mundo; los esfuerzos deben continuarse dirigidos no sólo a curar más pacientes, sino también a ocasionar el menor número de secuelas posible. Si se separa arbitrariamente el trasplante de células hematopoyéticas (TCH) en los tres aspectos más importantes que lo conforman, tal vez se dividiría en paciente/enfermedad, donante/CH y régimen de acondicionamiento; si, por otro lado, se pudieran elegir las características más importantes del régimen de acondicionamiento estas serían las de tener la capacidad de reducir o eliminar las células neoplásicas, poder suprimir lo suficiente el sistema inmune del paciente para que el rechazo sea evitado, y tener una reducida toxicidad.

LOS REGÍMENES MIELOABLATIVOS

En los pacientes con enfermedades neoplásicas sometidos a un TCH mieloablativo (TM), las CH actúan como rescate después de las altas dosis de quimioterapia administradas con el régimen de acondicionamiento. En los casos de enfermedades genéticas la quimioterapia del TM se utiliza básicamente para erradicar las células genéticamente anormales. Los intentos para incrementar la intensidad del régimen de acondicionamiento han resultado en tasas de toxicidad inaceptables.²⁴⁵

El primer régimen mieloablativo utilizado en la época moderna de los TCH consistió en la aplicación de radiación corporal total (RCT), sola o en combinación con ciclofosfamida,^{12,216,248} la radiación tenía, además de su efecto inmunosupresor, acción antineoplásica actuando independientemente del ciclo celular, la ciclofosfamida, por su parte, funcionaba como un agente quimioterapéutico con potente capacidad inmunosupresora y poca toxicidad no hematológica.

Desde entonces han surgido múltiples esquemas, siendo remplazada la ciclofosfamida por otros medicamentos, como etopósido, arabinósido de citosina o melfalan, que se administraban en combinación con la RCT, o también cuando ésta se sustituía por otras drogas.^{10,12,249-252}

La combinación de busulfan y ciclofosfamida resultó ser el esquema que sustituyó al original de ciclofosfamida y RCT en los TCH por leucemia aguda.^{253,254} Se sabe también desde

entonces que el mantenimiento de niveles plasmáticos adecuados de busulfan en este esquema era muy importante para reducir la tasa de recaída y, al mismo tiempo, disminuir también la toxicidad relacionada, dando lugar a un aumento de la supervivencia libre de evento.²⁵⁵ Los intentos por reducir la probabilidad de recaída en los pacientes, incrementando las dosis de las drogas utilizadas en el régimen de acondicionamiento, originaban con mucha frecuencia un aumento en la toxicidad relacionada con el régimen y, también, una mayor incidencia de formas graves de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), disminuyendo así la supervivencia libre de enfermedad y haciendo inaceptable el régimen que estaba siendo evaluado.

Los resultados de los TM fueron mejorando a medida que se avanzó en la selección del paciente a trasplantar, la utilización de técnicas más sensibles para la selección del donante, el uso de nuevos y más eficaces métodos para la prevención y tratamiento de la EICH, la aparición constante de nuevos agentes para la atención de procesos infecciosos y, en general, la mejor atención de los pacientes.²⁵⁶

LOS REGÍMENES NO MIELOABLATIVOS

Se acepta que los regímenes mieloablativos se relacionan con altas tasas de morbilidad y mortalidad, requiriendo también largas estancias hospitalarias; esto mismo hacía que pacientes de edad avanzada, o aquellos que ya sufrían de otras morbilidades, no fueran considerados para el procedimiento. El número de pacientes en estas circunstancias era elevado y, por lo tanto, sin un TCH las posibilidades de curación de muchos de ellos eran muy escasas. Este fue uno de los motivos más importantes para que surgieran los trasplantes no mieloablativos (TNM).

Los primeros estudios en animales y después en humanos establecieron nuevos principios en este campo de la Medicina, no se requería como se había pensado, que era necesario crear un espacio en la médula ósea del paciente con la administración de dosis altas de quimioterapia, ya que este espacio se podía generar por las mismas células madre del injerto por intermedio del efecto de injerto contra huésped y, por otro lado, la toma del injerto era promovida por la supresión post trasplante del efecto del huésped contra el injerto.

La confusión acerca de la terminología en esta variedad de trasplantes surgió desde sus inicios, cuando fueron conocidos con diferentes nombres: minitrasplantes, trasplantes ligeros, trasplantes no mieloablativos, trasplantes de intensidad reducida o de toxicidad reducida; en general los TNM se pueden definir como aquellos donde ocurre una afectación de la médula ósea del enfermo de carácter transitorio a la que sigue una completa recuperación hematológica, siendo el objetivo principal la inducción del efecto de injerto contra tumor.^{180,212,216,257}

A pesar de la publicación de múltiples esquemas no mieloablativos, en general se acepta que éstos se pueden dividir en dos grandes grupos, los de intensidad reducida y los regímenes mínimamente mielosupresores.^{13,14,245,258,259} Los de intensidad reducida requieren el efecto citotóxico de las drogas utilizadas en el acondicionamiento para evitar la reacción del huésped contra el injerto, aquí la aplasia ocurre tempranamente y el quimerismo completo también se obtiene de manera temprana después del trasplante. Los mínimamente mielosupresores, por su parte, se basan en la inmunosupresión que ocurre antes y después del trasplante y que previene el rechazo del injerto; en estos casos se adquiere un estado de quimerismo mixto que puede en un tiempo variable convertirse en un quimerismo completo.¹¹

En la tercera reunión del Grupo Europeo de Trasplante de Sangre y Médula Ósea se definió que este tipo de trasplante debe contar al menos con una de las siguientes características: RCT igual o menor a 200cGy, una dosis total igual o menor a 8mg/Kg de busulfan, una dosis igual o menor de 140mg/m² de melfalan y una dosis igual o menor de 10mg/Kg de thiotepa.²⁶⁰

Los regímenes de intensidad reducida se pueden dividir también en aquellos que contienen fludarabina, una droga análoga a las purinas con potente efecto inmunosupresor y escasa toxicidad, y los regímenes que se basan en la aplicación de una dosis baja de radiación corporal total.^{13,259} Entre los primeros se incluyen la combinación de fludarabina con globulina anti-timocito y busulfan, como en el estudio pionero de Slavin *et al.* en Jerusalén, y de idarrubicina y arabinósido de citosina empleado inicialmente por el grupo de Giralte en Houston, por citar solo dos ejemplos.^{14,245}

Mecanismo de Acción

Se ha demostrado que en las recaídas después de un TCH alogénico la infusión de linfocitos del donante puede lograr rescates de pacientes catalogados como incurables,²⁶¹⁻²⁶³ ofreciendo mejores resultados si se emplea de forma temprana, cuando la actividad neoplásica es mínima, en este caso se utiliza casi como medida preventiva y no como tratamiento por la presencia franca de actividad neoplásica; parece claro que debe ser menos complicado atender pacientes con pequeñas cargas tumorales que aquellos donde la enfermedad se encuentra en un estado avanzado.²⁶¹⁻²⁶⁴

El principal mecanismo de acción en los TNM lo constituye el efecto de injerto contra leucemia mediado por los linfocitos T del donante y no por la eliminación de las células malignas después de la aplicación de las dosis altas de quimioterapia. Este efecto se puede sustentar con diferentes evidencias, la persistencia de células neoplásicas en la primeras etapas del trasplante a pesar de haber un régimen mieloablativo,^{265,266} la disminución del riesgo de recaída cuando el paciente presenta EICH aguda o crónica²¹¹ y el mayor riesgo de recaída después de un trasplante singénico o cuando el trasplante se lleva a cabo con retirada de linfocitos T.^{211,265}

En los TNM parece que el rol más importante lo juega la inducción de un estado de tolerancia entre el huésped y el injerto derivada de los linfocitos T del donante, que tienen la capacidad de reconocer y erradicar las células malignas del paciente. El grupo de Slavin desarrolló este esquema después de llevar a cabo estudios con modelos animales en diferentes patologías, donde fue posible establecer la eficacia de las células alogénicas.^{261,262} Este efecto mediado por los linfocitos T es el más importante entre los mecanismos inmunoterapéuticos contra el cáncer^{14,211,267} y puede ocurrir aún en ausencia de EICH. Se ha sugerido una mayor sensibilidad de la célula leucémica a estos mecanismos,^{87,211} otra teoría plantea que existe una sobre-expresión de constituyentes en las células neoplásicas, pudiendo servir como blanco para la acción del efecto de injerto contra tumor.²⁶⁸

El efecto de injerto contra tumor se observa en diferentes grados de acuerdo a la patología de base, es intenso en la fase crónica de la leucemia mieloide crónica, algunos lo explican porque la proteinasa 3 que se expresa en los gránulos mieloides es un blanco ideal

para este efecto; mientras que el débil efecto observado en la leucemia linfoblástica aguda deriva tal vez del rápido ritmo de proliferación de los blastos linfoides que, además, carecen de la capacidad para estimular una adecuada respuesta inmunológica.^{87,268-271}

El objetivo de estos regímenes es favorecer el efecto de injerto contra tumor, sin embargo las maniobras llevadas a cabo para incrementarlo se relacionan también con un aumento en la gravedad de la EICH; de igual manera, cuando disminuye la gravedad de la EICH, disminuye también el efecto de injerto contra tumor.^{222,272-278}

Se ha sugerido que los trasplantes mínimamente mielosupresores pueden ser más apropiados para enfermedades hematológicas indolentes, como la leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica y linfomas de bajo grado;^{11,13,279-281} mientras que en los casos donde se requiere citorreducción, los de intensidad reducida serían una mejor opción. Otra estrategia propuesta, en la atención de estos casos donde se requiere disminuir la carga tumoral, sería someter a los pacientes inicialmente a un autotrasplante para inducir remisión y, después, a un TNM para consolidar la remisión previamente obtenida por medio del efecto de injerto contra tumor.²⁸²⁻²⁸⁴

Las publicaciones con el análisis retrospectivo donde se comparan resultados con TCH mieloablatoivo y no mieloablatoivo no muestran diferencias en la supervivencia global; sin embargo, las recaídas son más comunes después de los TNM.²⁸⁵⁻²⁸⁷ La mortalidad relacionada con el procedimiento a los 100 días y al año después del TCH ha sido referida en 3 y 16%, respectivamente, porcentajes significativamente menores que los obtenidos con los trasplantes mieloablatoivos. La EICH aguda no parece tener participación importante en el riesgo de progresión de la enfermedad de base, pero sí se ha asociado con la mortalidad no relacionada con recaída; también se ha observado una disminución en las tasas de aparición de la ECH aguda cuando la inmunosupresión se administra durante un período más largo.²⁸⁸

Con respecto a la EICH crónica, no se encontraron diferencias significativas, sin embargo ésta sí se ha asociado con una disminución en el riesgo de recaída y con un aumento en la supervivencia libre de evento.²⁸⁹ Parece quedar muy claro que, si bien deben

establecerse estrategias para el manejo adecuado de la EICH, ésta debe reducirse, pero no evitarse por completo para que subsista el efecto de injerto contra tumor.

El estado de quimerismo mixto que se observa en los TCH no mieloablativos puede también ayudar a disminuir tanto la incidencia como la gravedad de la EICH por medio de un estado de tolerancia inmunológica, tanto en el huésped como en el injerto.

Desde la publicación original del grupo de Slavin se han descrito importantes ventajas de este método,^{290,291} entre las que se incluyen la baja incidencia de mucositis y procesos infecciosos agregados, como consecuencia de un período de neutropenia más breve, un menor número de transfusiones plaquetarias y una tasa muy baja de complicaciones propias de los regímenes mieloablativos, como la neumonía intersticial y la enfermedad veno oclusiva hepática. Los niños también se ven beneficiados por la reducción de las muy importantes complicaciones a largo plazo, como las alteraciones en el crecimiento y la infertilidad asociada con las altas dosis de quimio y radioterapia de los regímenes mieloablativos.

Experiencia en Adultos

Conviene mencionar las características de algunos de los informes más importantes de pacientes trasplantados con regímenes no mieloablativos, iniciando con el artículo original de Slavin *et al.*,²⁴⁵ en Jerusalén. Estos autores disminuyeron la dosis del busulfan administrado por vía oral, combinándolo con fludarabina y globulina anti-timocito para convertir el régimen de acondicionamiento en uno no mieloablativo; las CH infundidas fueron obtenidas de la sangre periférica del donante previa estimulación con FEC-G. El efecto de injerto contra leucemia mediado por las cuentas altas de linfocitos T inmunocompetentes podía, tiempo después, ser incrementado por medio de la infusión de linfocitos del donante; todo lo anterior dio como resultado la erradicación de las células malignas con una muy baja toxicidad relacionada con el procedimiento, las complicaciones más graves reportadas se dieron por EICH aguda que ocurrió al suspender súbita y rápidamente la ciclosporina.

Es importante mencionar que en el grupo de pacientes se incluyeron cinco menores de 18 años de edad, se sugería "que este esquema podía ser ofrecido con seguridad a pacientes de todas las edades, con una incidencia baja de complicaciones agudas y a largo plazo"; no obstante, la mayor parte de los grupos pediátricos ofrecieron el procedimiento a niños hasta varios años después.

En 1997 Giralt *et al.*¹⁴ publicaron la experiencia de 15 pacientes con leucemia mieloblástica aguda o mielodisplasia, 12 de ellos tenían enfermedad refractaria o más de una recaída y no eran candidatos para un trasplante convencional, los donantes eran familiares idénticos o con una sola discordancia en el HLA, 14 recibieron CH de sangre periférica y uno de médula ósea. Se utilizaron tres acondicionamientos diferentes, a siete pacientes se les administró fludarabina, idarrubicina y arabinósido de citosina, uno recibió lo anterior pero utilizando melfalan en lugar de arabinósido de citosina, y los otros siete recibieron cladribina y arabinósido de citosina. La prevención para EICH fue con ciclosporina y metilprednisolona. A los sesenta días, ocho pacientes obtuvieron la remisión con recuperación de neutrófilos y sin recibir transfusiones de plaquetas, seis de estos pacientes mostraron un quimerismo superior al 90%.

Childs *et al.*²⁹² también presentaron un grupo de once pacientes con enfermedades hematológicas que recibieron ciclofosfamida y fludarabina como acondicionamiento y CH de sangre periférica, la ciclosporina en este caso se redujo paulatinamente a partir del día 30; en sus resultados, diez pacientes tuvieron un quimerismo completo, cuatro casos presentaron EICH grados III-IV y ningún caso EICH crónica.

En Seattle, cincuenta y dos pacientes fueron trasplantados de donantes familiares y no emparentados, recibiendo fludarabina y RCT, el 88% de ellos habían fallado a un TCH mieloablativo o tenían enfermedad avanzada o refractaria. Además recibieron ciclosporina y micofenolato, se obtuvo un quimerismo completo en el 88% de los enfermos, 63% desarrollaron EICH aguda grados II-IV, la mortalidad relacionada con el trasplante en el día 100 fue del 11%, la mayor parte de ellos por EICH. Con una mediana de seguimiento de 19 meses, el 35% de los pacientes estaban vivos y el 25% libres de la enfermedad de base. Hay

que insistir en que se trataba de un grupo de pacientes con un riesgo muy alto para presentar complicaciones.

Resultados muy interesantes surgieron del estudio de Pérez Simon *et al.*,²⁹³ donde de manera retrospectiva se evaluaron los resultados de un grupo de 129 enfermos con patologías linfoproliferativas crónicas que recibieron un trasplante con CH de sangre periférica. En todos se utilizó un acondicionamiento con fludarabina y melfalan, 78 de los pacientes recibieron además alemtuzumab, al resto de los pacientes se les administró ciclosporina y tres dosis de metotrexato. Se encontró una menor incidencia de EICH, tanto aguda como crónica, en quienes recibieron alemtuzumab, también se observó una tasa más alta de reactivación por citomegalovirus. La respuesta en cuanto al control de la enfermedad neoplásica fue mejor en el grupo que no recibió alemtuzumab y sí metotrexato; sin embargo, cuando a aquellos que recibieron alemtuzumab se les infundieron linfocitos del donante los resultados básicamente fueron los mismos, sin incrementar el riesgo de EICH, ejemplificando una vez más la importancia del valor inmunoterapéutico de la infusión de linfocitos del donante.

Experiencia en Niños

La experiencia en niños es limitada, los primeros reportes en pacientes pediátricos ocurrieron al menos tres años después de los artículos originales de Slavin *et al.* y Giralt *et al.* Del Toro *et al.*²⁷² publicaron un informe de 21 niños con regímenes muy diversos, donde el más utilizado fue la combinación de fludarabina y busulfan, para diferentes patologías y también con diferentes fuentes de CH; las tasas más altas de toma de injerto se obtuvieron al utilizar unidades de sangre de cordón umbilical de donantes no relacionados. En general, hubo fracaso del injerto en el 24% de los trasplantes, y en el 85% del grupo se obtuvo un quimerismo de más del 50%. A pesar de tratarse de un estudio con datos muy heterogéneos, se pudo concluir que era factible realizar este tipo de trasplantes en niños y que las unidades de sangre de cordón umbilical podían ser también utilizadas para estos fines.

Iannone *et al.*,²⁹⁴ en 2003, refirieron siete TNM mínimamente inmunosupresores en pacientes con hemoglobinopatías donde las CH se obtuvieron de médula ósea de donantes

familiares compatibles con un régimen basado en RCT y fludarabina, ningún paciente logró una toma de injerto sostenida. Se concluyó que en los pacientes inmunocompetentes con hemoglobinopatías la toma de injerto era más difícil y, muy probablemente, podría explicarse por la sensibilización previa a los antígenos menores de histocompatibilidad que ocurría por las transfusiones previas que todos ellos habían recibido.

En 2004, Jacobshon *et al.*²⁹⁵ publicaron su experiencia con TCH de intensidad reducida en 13 niños con enfermedades no malignas; con variaciones mínimas, el acondicionamiento consistió en una combinación de busulfan, fludarabina y globulina anti-timocito. La fuente de CH fue también diversa, de familiares idénticos y de donantes no emparentados, tanto adultos como de unidades de sangre de cordón umbilical (SCU). La recuperación plaquetaria y de neutrófilos ocurrió con una media de 18 y 13 días, respectivamente. El 72% de los enfermos logró un quimerismo completo y duradero, la tasa de EICH aguda fue sólo el 8%, siendo la mortalidad relacionada con el trasplante del 15%.

Los pacientes que no obtuvieron toma de injerto fueron nuevamente aquellos con hemoglobinopatías; está claro que los resultados de este grupo fueron muy satisfactorios, convirtiéndose en uno de los primeros grupos de pacientes con trasplantes no mieloablativos que obtenía resultados tan favorables. Conviene además mencionar que los trasplantes de estos pacientes se planearon inicialmente para ser realizados de manera ambulatoria, admitiéndolos al hospital solo cuando se presentaran complicaciones; el promedio de días de hospitalización fue de siete días. Es importante señalar en mi opinión que, a pesar de haber sido practicados en un país del primer mundo, se han explorado los beneficios del procedimiento ambulatorio.

Duesrst²⁹⁶ reportó 11 casos de niños con LLA de muy alto riesgo que no podían ser trasplantados de manera convencional y que recibieron un acondicionamiento con fludarabina, busulfan y globulina anti-timocito. El 36% de ellos logró un quimerismo alto; hubo dos casos de EICH aguda grave y dos de los cinco supervivientes desarrollaron EICH crónica. La mortalidad relacionada con el trasplante fue elevada (50%).

Roman *et al.*²⁹⁷ describieron la experiencia de 8 niños con LMA CD33+ en primera o segunda remisión, ellos recibieron la combinación de gemtuzumab-ozogamicina y un TCH con busulfan, fludarabina +/- globulina anti-timocito y micofenolato y tacrolimus como prevención para EICH; la supervivencia global fue del 63% con tasas muy bajas de morbilidad, mortalidad y EICH aguda y crónica, resultados muy comparables a los obtenidos con trasplantes mieloablativos.

El Hospital Great Ormond de Londres fue pionero en los TNM para niños con inmunodeficiencias primarias,^{298,299} utilizando una combinación de fludarabina, melfalan y alemtzumab en niños con comorbilidades graves. En su último informe de más de 100 pacientes trasplantados tuvieron más del 80% de supervivencia global y de toma de injerto, muchas veces con quimerismos mixtos estables; aunque la comparación que efectuaron con trasplantes mieloablativos no fue aleatoria, la supervivencia global fue superior, y menor la mortalidad relacionada con el trasplante en los no mieloablativos. El mismo grupo,³⁰⁰ utilizando un nuevo esquema con treosulfan (en lugar de busulfan), fludarabina y alemtzumab, en la mayor parte de 40 niños con inmunodeficiencias primarias y diferentes fuentes de CH -principalmente de donantes no emparentados-, obtuvieron toma de injerto en 38 de los 40 pacientes, 24 con quimerismo completo y 13 con quimerismo mixto de alto nivel, estos son los mejores resultados obtenidos hasta ese momento.

Trasplante con Regímenes No Mieloablativos y Sangre de Cordón

Está completamente establecida, desde la década de los noventa, la importancia de la dosis de células CD34 o de las células mononucleares en los TCH que se practican con unidades de sangre de cordón umbilical (SCU), como fuente de las CH en niños.^{69,77,257,301} En adultos es obvio que las cuentas reducidas de CH desempeñan un papel aún más importante, la utilización de los TNM con unidades de SCU es una de las maniobras que han sido sugeridas para tratar de minimizar este hecho, aceptando que seguramente ésta es la desventaja más importante de esta fuente de CH y que da lugar a una toma de injerto retardada, lo que, a su vez, se traduce en una fase aplásica de mayor duración y, con ello, un incremento en el riesgo de complicaciones principalmente infecciosas.

Los TNM usualmente permiten una toma de injerto más rápida debido a la reducción de la dosis de los agentes quimioterapéuticos utilizados, por lo que su uso en el grupo de pacientes que reciben un trasplante de cordón umbilical permitiría combatir la desventaja referida de esta variedad de fuente de las CH. Una de las primeras experiencias publicadas en pacientes adultos la realizaron Barker *et al.*,³⁰² su estudio incluyó 43 pacientes trasplantados utilizando dos diferentes regímenes de acondicionamiento, donde el que empleó la combinación de fludarabina, ciclofosfamida y RCT a una dosis de 200cGy obtuvo mejores resultados en cuanto a toma de injerto y tiempo de recuperación de neutrófilos, con respecto a la combinación que incluía busulfan en lugar de ciclofosfamida. Otros grupos reportaron también sus resultados con sangre de cordón umbilical y también con donantes no emparentados.³⁰³⁻³⁰⁵

Trasplantes No Mieloablativos como Rescate y Donantes Haploidénticos

En el año 2010 se presentó el reporte de 12 pacientes que habiendo recaído después de un trasplante autólogo fueron sometidos a un TNM. Se utilizó un esquema de fludarabina y melfalan; cinco de los 12 pacientes lograron una SLE prolongada. No ha sido aún definida la mejor estrategia para este grupo de pacientes, parecería que con el antecedente de las dosis altas de quimioterapia recibidas en el autotrasplante, la mortalidad relacionada con el procedimiento sería menor con un trasplante no mieloablativo.³⁰⁶ Considerando que al menos en nuestro país no es posible contar con fludarabina intravenosa, vale la pena comentar una publicación española que comparó la utilización de fludarabina administrada por vía oral con la vía intravenosa, sin encontrar diferencias significativas entre las dos presentaciones. Más recientemente un grupo mexicano demostró los mismos hallazgos; estos resultados permiten continuar llevando a cabo el TCH de la misma manera.^{307,308}

Recientemente han sido publicados también reportes con resultados satisfactorios de TCH no mieloablativos con CH obtenidas de donantes haploidénticos, tanto en niños como en adultos. Los regímenes de acondicionamiento han sido variables y la reducción de linfocitos T se ha llevado a cabo tanto *in vivo* como *ex vivo*.³⁰⁹⁻³¹¹

Estudios de Quimerismo

Es importante mencionar la trascendencia de los estudios de quimerismo en los pacientes trasplantados con acondicionamientos no mieloablativos. Muchos de estos pacientes, debido a la reducción de las dosis de los agentes utilizados en el acondicionamiento, pueden no mostrar los grandes descensos de neutrófilos y plaquetas; por ello, para la toma de decisiones se hace crucial la determinación y seguimiento del quimerismo. Se sabe además que un quimerismo completo es el objetivo en los trasplantes de pacientes con enfermedades neoplásicas, pero se acepta también que un quimerismo mixto y estable puede ser suficiente para niños trasplantados por enfermedades no malignas, como las inmunodeficiencias o las enfermedades del metabolismo. Cuando se llevan a cabo estudios de quimerismo de manera seriada, también es posible tomar ciertas decisiones, como suspender la inmunosupresión utilizada para evitar la aparición de la EICH o considerar la infusión de linfocitos del donante.^{312,313}

El Factor Económico de los Trasplantes No Mieloablativos

En otro orden de ideas, conviene considerar también un aspecto muy importante, que ha sido ya mencionado en la discusión general de la experiencia de nuestro grupo, y que se refiere al aspecto económico de los TNM. Entre sus características, y como consecuencia de la disminución de la toxicidad relacionada con el procedimiento, destaca el tener muchas veces un valor económico muy inferior al de los trasplantes convencionales; esto constituye por sí mismo un factor de gran importancia para nosotros pues nos permite llevar a cabo un mayor número de procedimientos. De alguna forma también se relaciona con la posibilidad de practicar este tipo de tratamientos especializados de manera ambulatoria, pues ésta es una situación que permite también realizar trasplantes más económicos.³¹⁴⁻³¹⁷

Conclusión

Los TCH son todavía procedimientos que se encuentran en constante evolución, incluyendo a los TNM, y está claro que se requieren más estudios comparativos, con poblaciones de pacientes lo suficientemente grandes, que permitan establecer con más claridad respuestas a preguntas que aún no han sido contestadas, como son, por mencionar

algunas: ¿cuál es el mejor régimen?, ¿debe ser diferente para cada grupo particular de enfermedades?, ¿cuál es la cifra y la fuente ideal de las CH?, ¿qué maniobras deben establecerse para tratar la EICH grave?, y ¿existen enfermedades que no deben ser trasplantadas por este método?

Los Trasplantes de Células Hematopoyéticas con Regímenes No Mieloablativos en un Hospital Universitario en México

La manera en la que el trasplante de células hematopoyéticas se introdujo como una opción terapéutica en los pacientes hematológicos de nuestro servicio estuvo rodeada de una serie de características poco comunes. Todo se inició en 1988 cuando en nuestro hospital se llevó a cabo el primer procedimiento de este tipo; se trataba de un joven de 20 años de edad con leucemia linfoblástica aguda en segunda remisión completa después de recaer a médula ósea de manera temprana. En él se llevó a cabo el procedimiento utilizando médula ósea de un hermano HLA idéntico, como fuente de las células hematopoyéticas, se utilizó un régimen de acondicionamiento mieloablativo con ciclofosfamida y busulfan. La evolución del paciente fue muy tórpida y no se logró recuperación hematológica, falleciendo por sepsis bacteriana durante los primeros días del trasplante.

Ahora resulta claro para nosotros que las condiciones en las que se llevó a cabo el procedimiento no eran las óptimas, se tenía la intención de resolver un problema grave contando con todo el apoyo del paciente y su familia, pero no disponíamos entonces de equipo de aféresis, medición de niveles de ciclosporina y de equipo médico bien constituido para realizar el procedimiento, entre otras cosas. En vista de la muy difícil primera experiencia en este campo, se estableció una política orientada inicialmente a afianzar los procedimientos que ya llevábamos a cabo y, también, a establecer metas para la implementación programada de conductas, adquisición de equipos y entrenamiento del personal que iba a participar en el procedimiento. Esto nos llevó aproximadamente seis años. En 1996 iniciamos de nuevo nuestro programa y, para entonces, ya se contaba prácticamente con todo lo necesario; esta etapa coincidió con el afianzamiento de la sangre periférica como fuente de las CH para los trasplantes.

En 1997 realizamos nuestro primer trasplante en un niño,³¹⁸ se trataba de un lactante con diagnóstico de linfohistiocitosis hemofagocítica; no establecimos en ese entonces si se trataba de la forma familiar o secundaria, pero en vista de la edad de aparición de los primeros síntomas (2 meses) consideramos que se trataba de la forma primaria. Una vez lograda la remisión de la enfermedad se practicó un TCH alogénico, donde la hermana mayor del paciente -en ese entonces de 8 años de edad- fue la donante de las CH que se obtuvieron de su médula ósea. En aquel momento no existía aún información sobre los trasplantes utilizando regímenes de acondicionamiento no mieloablativos, toda la experiencia publicada sobre el procedimiento del trasplante para niños con esta enfermedad se basaba en regímenes mieloablativos donde, a pesar de los buenos resultados descritos, también se insistía en la alta tasa de complicaciones agudas derivadas del programa de quimioterapia administrado.

Por lo anteriormente mencionado decidimos llevar a cabo el trasplante, pero realizando un ajuste en la dosis de los medicamentos del acondicionamiento. De acuerdo a las dosis reportadas, decidimos no modificar la dosis de busulfan, pero sí disminuir la dosis total de ciclofosfamida desde 200mg a 150mg/Kg de peso del paciente; con respecto al etopósido, la dosis inicialmente referida por Kg de peso era de 1500mg y poco después se redujo a 900mg, nosotros decidimos reducirla aún más, a una dosis total de 600mg/Kg. Teníamos claro que el objetivo principal era curar a nuestro paciente, pero intentando también conseguirlo con el menor grado de toxicidad posible. El paciente obtuvo una recuperación hematológica temprana y pudo irse a casa apenas 16 días después de la infusión de las células; desarrolló EICH aguda moderada que respondió a la administración de prednisona y, 17 años después, hace una vida normal y sin secuelas.

En 1998 aparecieron las primeras publicaciones acerca de los trasplantes no mieloablativos o mini trasplantes, como fueron también conocidos inicialmente. Ahora se acepta por la mayor parte de los grupos que en la linfohistiocitosis hemofagocítica, los trasplantes con este tipo de regímenes de acondicionamiento son los que están indicados como primera opción terapéutica. Desde entonces para nosotros era muy importante el tema de la toxicidad, tanto aguda como crónica, ya que las secuelas que muchos de los

pacientes podían presentar a largo plazo estaban relacionadas, muchas veces, con el régimen de acondicionamiento utilizado. Gracias al resultado obtenido con este paciente, nuestro grupo afianzó esta idea y, durante muchos años, realizamos sólo trasplantes utilizando este método que, con el tiempo y los resultados obtenidos, ha logrado establecerse como una opción muy importante en la práctica de los trasplantes.

En el año 2000 nuestro grupo publica nuestra primera serie de pacientes trasplantados con un régimen de acondicionamiento no mieloablativo, basado en la administración de fludarabina con ciclofosfamida y busulfan.³¹⁹ Esta serie de pacientes fueron trasplantados básicamente durante el año 1998, en respuesta a las publicaciones acerca de esta nueva modalidad de trasplantes. Se trataba de dos pacientes con leucemia mieloide crónica en fase crónica y dos pacientes pediátricos, uno con leucemia mieloide aguda en remisión y una mujer de 15 años de edad que, de hecho, fue la primera paciente trasplantada con este método. Todos los pacientes fueron trasplantados con donantes familiares idénticos y en todos los casos las CH se obtuvieron de la sangre periférica de los donantes previa estimulación con FEC-G. Todos los pacientes injertaron tempranamente y no fueron transfundidos, excepto uno que recibió una unidad de plaquetoféresis. La enfermedad de injerto contra huésped ocurrió en grado leve en uno solo de los pacientes. Con una mediana de seguimiento de 285 días todos los pacientes se encontraban injertados, demostrado por estudios de quimerismo, y libres de su enfermedad de base y también de EICH.

Un aspecto a resaltar de este pequeño grupo de pacientes fue el hecho de que en todos ellos el trasplante se pudo llevar a cabo de manera ambulatoria, es decir, todo el procedimiento -desde la aplicación de la quimioterapia de acondicionamiento hasta que el paciente mostró recuperación hematológica- se llevó a cabo sin que los pacientes estuvieran ingresados en el hospital. Es claro que para entonces ya contábamos con un Servicio que podía llevar a cabo todo lo necesario con nuestros pacientes en la consulta, siempre y cuando el paciente reuniera las condiciones exigidas para el trasplante de este tipo. Esta conducta además de ofrecer a los pacientes una atención más relajada, pues se mantenían en casa la mayor parte del día, se tradujo también en una muy importante reducción de los costes económicos del procedimiento. Para un país como el nuestro, donde el factor

económico era la principal razón de que sólo se trasplantase a menos del 5% de los pacientes que lo requerían, la reducción del coste del trasplante fue desde entonces una prioridad de nuestro grupo, como se discutirá más adelante.

Los excelentes resultados obtenidos con estos cuatro pacientes nos incentivaron a continuar con el fortalecimiento de nuestro grupo de trasplantes, que tenía entre sus características más importantes la de obtener las CH de la sangre periférica de los donantes previa estimulación. Hasta entonces, los donantes eran siempre familiares idénticos y el régimen de acondicionamiento utilizado en todos los casos era no mieloablativo, tratando de llevar a cabo el trasplante cuando el paciente reuniera las características necesarias de manera ambulatoria.

En 2003 publicamos el reporte de 21 pacientes menores de 20 años de edad con diversos diagnósticos a quienes se les practicó un TNM; fueron evaluados de manera prospectiva dando seguimiento a nuestra estrategia de ofrecer esta modalidad de trasplantes a nuestros pacientes.³²⁰ El diagnóstico de los 21 pacientes incluía tanto enfermedades neoplásicas como no malignas, siendo el más común la leucemia linfoblástica aguda. Se insistía en el hecho de que en este tipo de trasplantes se habían obtenido buenos resultados y ofrecían como ventaja adicional la reducción en la toxicidad a largo plazo, situación especialmente importante en pacientes de este grupo de edad.

En todos los casos el donante fue un hermano HLA idéntico y la obtención de las CH fue de la sangre periférica de los donantes previa estimulación. Básicamente se utilizaron dos regímenes de acondicionamiento diferentes, en ambos la fludarabina se administró de manera similar; sin embargo, en 18 de los pacientes se combinó con ciclofosfamida y busulfan, mientras que en tres enfermos con patologías no neoplásicas el busulfan se substituyó por melfalan. La prevención para la EICH se llevó a cabo con ciclosporina A y metotrexato.

La mediana de recuperación para neutrófilos y plaquetas fue de 13 días y la mediana del número de transfusiones de concentrado eritrocitario y de plaquetas fue de una unidad. Once de los veintiún trasplantes se realizaron de manera totalmente ambulatoria.

Las tasas observadas de EICH aguda y crónica fueron alrededor del 10%. Fallecieron nueve pacientes de los 21, cinco por recaída de la enfermedad de base y cuatro de ellos por toxicidad relacionada con el procedimiento, dos por EICH y dos por procesos infecciosos. A los 34 meses de seguimiento, la supervivencia global era del 55%, la cual era mejor para los pacientes con enfermedades no malignas, con diferencias estadísticamente significativas.

Al incluir el grupo más pacientes fue posible observar el beneficio de la combinación de nuestras tres principales estrategias: primera, la rápida recuperación hematológica, explicada al menos en parte por ser la sangre periférica la fuente de las CH; segunda, la disminución de la toxicidad aguda, explicada por el empleo del régimen de acondicionamiento no mieloablativo; y tercera, la significativa reducción del coste del trasplante, relacionada con la práctica ambulatoria en casi la mitad de los casos.

En aquel momento, el empleo de los regímenes mencionados estaba ya afianzado en mucho lugares y era ya considerado como una opción razonable para ser utilizada en los TCH.

Un dato aún no definido en vista de lo corto del seguimiento en este grupo fue la evaluación de la toxicidad a largo plazo, situación que era y sigue siendo primordial, especialmente en niños.

Es importante insistir en que para nosotros cualquier medida razonable que pudiera lograr la reducción del coste del trasplante era bienvenida; sobre todo, si consideramos que en la época en que estos pacientes fueron trasplantados, inicio de siglo, más del 90% de los niños que en México requerían un trasplante se quedaban sin él, y conociendo el hecho de que una vez se tiene la indicación para el trasplante, la no realización del mismo conlleva para casi todos perder la vida.

Nuestro grupo publicó en 2006 el informe de un lactante con linfocitosis hemofagocítica;³²¹ sugerimos que se trataba de la forma familiar debido a la edad temprana de aparición (3 meses), sin embargo, no realizamos estudios citogenéticos para tratar de demostrarlo por el alto valor económico que estas pruebas implican. Un par de años

después la hermana menor de nuestro paciente desarrolló la enfermedad, por lo que ahora podemos afirmar que se trataba de la forma familiar.

Una característica clínica importante en nuestro paciente fue la afectación del sistema nervioso central que pudimos corroborar por medio de resonancia magnética nuclear. Ya estaba establecido que esta afectación no suponía contraindicación para la realización del procedimiento del trasplante. Una vez que logramos el control de la enfermedad, incluyendo la afectación neurológica, decidimos practicar el TCH. Considerando que existía el antecedente de consanguinidad llevamos a cabo los estudios para la determinación del HLA en el padre del paciente, que era hijo único; afortunadamente el padre resultó idéntico y fue por lo tanto el donante de las CH que se obtuvieron de la sangre periférica previa estimulación. El trasplante fue exitoso, se logró un quimerismo completo y, nueve años después, el paciente está libre de linfocitosis, sin datos de EICH y sin secuelas.

Nuestro paciente fue sometido a un trasplante con un régimen no mieloablativo. Ya fue comentada previamente nuestra experiencia con otro caso de la misma enfermedad que fue trasplantado por nuestro grupo con un régimen mieloablativo "menos tóxico", cuando aún no se habían publicado las primeras informaciones acerca de esta modalidad de trasplantes. En el año 2005, cuando se llevó a cabo el procedimiento, existía muy poca información sobre el uso de los TNM, apenas se habían publicado dos artículos con pacientes sometidos a un TCH de estas características. Se insistía en estas publicaciones que con los trasplantes mieloablativos la toxicidad a largo plazo, particularmente la que se refería a la afectación endocrina, a la fertilidad y a las alteraciones en el crecimiento, sería más probablemente observada en los niños con linfocitosis, ya que estos usualmente eran trasplantados a muy corta edad.

Desde entonces, cuatro pacientes más han sido trasplantados por nuestro grupo con el mismo método, tres de ellos tienen entre dos y seis años de seguimiento y, al igual que el caso que nos ocupa, están libres de enfermedad y sin secuelas; un hecho que para nuestro grupo siempre ha estado dentro de los objetivos principales en la atención de nuestros niños.

En el año 2007 publicamos la experiencia con nuestro grupo más numeroso de pacientes trasplantados con un régimen no mieloablativo.³²² Se trataba de 132 pacientes con enfermedades diversas y con edades entre 1 y 71 años. Se sabe que la mayor parte de los pacientes sometidos a un trasplante convencional requerirán un internamiento hospitalario de entre tres y cinco semanas; el coste económico de un procedimiento de este tipo es muchas veces prácticamente imposible de soportar, especialmente en países en desarrollo. Este es sin duda uno de los factores más importantes que hicieron que nuestro grupo de trabajo se inclinara por desarrollar el TCH alrededor de los trasplantes no mieloablativos o de intensidad reducida.

El concepto en el que descansa el TNM es el de lograr, mediante un potente efecto inmunosupresor, un prendimiento rápido del injerto y, posteriormente, observar a la par un efecto del injerto contra el huésped -manifestado por la enfermedad propiamente dicha- y también un efecto de injerto contra tumor -que permitirá erradicar la enfermedad de base. Originalmente fue diseñado para lograr trasplantar a pacientes con malas condiciones generales, la mayor parte de las veces explicadas por su edad avanzada; sin embargo, nosotros creímos desde el inicio de las publicaciones de este tema que la población pediátrica debía también beneficiarse de esta modalidad de trasplante, habida cuenta de que los niños, a pesar de "tolerar" mejor los regímenes mieloablativos convencionales, deberían ser protegidos tanto de la toxicidad aguda como, y muy especialmente, de la que pudieran desarrollar crónicamente. Diversos esquemas han sido propuestos para llevar a cabo el trasplante en estas condiciones, nosotros le llamamos al nuestro "método mexicano", donde una de sus características más importantes es valorar desde el inicio la posibilidad de llevarlo a cabo de manera ambulatoria.

Se incluyeron 132 pacientes trasplantados entre 1999 y 2005 con enfermedades malignas y también no neoplásicas. En todos los casos los donantes fueron familiares idénticos en el HLA y las CH se obtuvieron de la sangre periférica previa estimulación. El régimen utilizado siempre fue no mieloablativo con la combinación de fludarabina, ciclofosfamida y busulfan, los cuales eran administrados en nuestra clínica de trasplantes. La profilaxis para EICH consistió en ciclosporina y metotrexato. La condición para llevar a cabo

el TCH de manera ambulatoria era contar con una escala de Karnofsky o similar superior al 70%, nivel sérico de creatinina menor de 2mg/dl, contar con una habitación limpia y disponibilidad de acceso telefónico las 24 horas del día con el familiar o su cuidador. También fue considerado el hecho de que los familiares del enfermo tuvieran un grado de educación suficiente que hiciera seguro el día a día del trasplante, ellos iban a ser los encargados de la administración de los medicamentos en casa, la preparación de los alimentos, vigilar la higiene de los enfermos e informar al equipo de trasplantes de cualquier anomalía. Los datos que hacían necesaria la admisión hospitalaria, en cualquier momento del procedimiento una vez iniciado el régimen de acondicionamiento, eran fiebre, intolerancia a la vía oral, diarrea, hemorragia anormal e ictericia.

En ciento tres enfermos (78%) de los 132 pacientes del estudio se pudo llevar a cabo todo el procedimiento de manera ambulatoria, en 29 pacientes (22%) se requirió internamiento por diferentes razones, como por ejemplo fiebre, mucositis o EICH aguda.

Se compararon diferentes variables entre los dos grupos de pacientes, aquellos con trasplante ambulatorio y los que requirieron internamiento, como edad, enfermedad maligna, hemoglobina, cuenta de plaquetas y de leucocitos, nivel sérico de ciclosporina y escala de Karnofsky, sin que encontráramos diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables estudiadas.

La razón primordial para implementar el programa de TNM fue reducir el coste, pero este programa también permitió llevar a cabo el trasplante de manera ambulatoria. En un principio, existía muy poca información al respecto y la que había era prácticamente solo sobre trasplantes autólogos. Tal vez el único estudio realizado por un grupo diferente al nuestro y que exploró esta maniobra había encontrado algunas importantes ventajas cuando la fase aplásica del trasplante, una vez administrado el acondicionamiento, se realizaba de manera ambulatoria, por ejemplo, reducción del riesgo de EICH y de la mortalidad relacionada con la toxicidad, menos días de alimentación parenteral, alta más temprana de la clínica ambulatoria y una muy significativa, la que se refería al incremento en la sensación de bienestar por pasar más tiempo en casa y con su familia. Por otro lado, la disminución del

número de días de internamiento cuando se utiliza el método no mieloablativo comparado con la quimioterapia mieloablativa ya había sido previamente demostrada.

El TCH ambulatorio no se puede ofrecer a todos los enfermos. A pesar de no haber encontrado en nuestro estudio diferencias significativas en las variables estudiadas, nosotros generalmente lo ofrecemos a aquellos pacientes que estén asintomáticos, totalmente activos, que cuenten con la posibilidad de ser cuidados por miembros de su familia, los cuales deberán contar con un nivel de educación suficiente para estos fines, y contar siempre con una clínica que funcione de manera permanente todos los días y que sea atendida por personal cualificado.

Creemos que los trasplantes en los que se utilice la combinación de regímenes no mieloablativos con ser llevados de manera ambulatoria hará posible que cada vez más pacientes sean trasplantados.

La experiencia de nuestro grupo con alemtuzumab, como tratamiento para la EICH aguda refractaria a esteroides, fue publicada en el año 2008;³²³ desde siempre esta complicación del TCH constituye una de las principales causas de muerte en los pacientes trasplantados, los corticoesteroides constituyen todavía la primera opción terapéutica.

El alemtuzumab corresponde a un anticuerpo monoclonal humanizado, de tipo IgG, no conjugado y dirigido contra el antígeno CD52, que se encuentra tanto en linfocitos T como en linfocitos B. Inicialmente se diseñó para ser utilizado como un agente para retirar linfocitos T en los TCH alogénicos y, de esta manera, disminuir las posibilidades de desarrollar EICH. Basándonos en reportes de casos anecdóticos de respuestas favorables en pacientes trasplantados que fueron resistentes a esteroides en el tratamiento de la EICH y, por otro lado, en su administración como parte del régimen de acondicionamiento con el fin de disminuir la incidencia de la misma, decidimos iniciar una evaluación prospectiva del efecto del alemtuzumab en un grupo de 18 pacientes trasplantados.

Los pacientes incluidos tenían diferentes diagnósticos, con un rango de edad entre 1 y 59 años, con una mediana de 37; 17 casos correspondían a trasplantes de donante idéntico y en el otro las CH se obtuvieron de una unidad de SCU de un donante no familiar, todos

habían desarrollado al menos grado II de EICH aguda de acuerdo al consenso internacional (sin respuesta después de cinco días de tratamiento o con progresión después de 48 horas) y habían sido catalogados como resistentes. No debían haber recibido previamente ningún agente inmunosupresor diferente a corticoesteroides o inhibidores de calcineurina. Otros criterios incluían no padecer infecciones no controladas o insuficiencia renal o cardíaca en el momento de entrar en el protocolo.

Se definió como respuesta completa la resolución total de la enfermedad en el día 28; respuesta parcial, la mejoría -en al menos un órgano- de al menos un grado en la escala y sin que ocurriera progresión en otro sitio; la no respuesta se estableció como la falta de respuesta en los catorce días que siguieron al tratamiento o cuando ocurrió empeoramiento de la enfermedad.

Todos recibieron tratamiento profiláctico para diversas infecciones y la dosis del alemtuzumab fue de 10mg diarios durante 5 días por vía subcutánea; en un paciente de 1 año de edad, la dosis se redujo a 3mg con la misma frecuencia y vía.

El hígado fue el órgano más afectado, 10 de los 18 enfermos tenían una EICH grado III o IV, la mediana de aparición de la enfermedad fue de 45 días y ocho casos la manifestaron tardíamente. Uno de los 18 pacientes recibió un régimen mieloablativo y 17, uno de intensidad reducida; las CH se obtuvieron de la sangre periférica del donante, excepto en un caso que fue de cordón umbilical. Ciclosporina A y metotrexato fue el método utilizado como prevención, en el caso del TCH con SCU se utilizó solo ciclosporina.

Se observó respuesta completa en seis enfermos, cinco de manera sostenida y respuesta parcial en nueve. En los quince enfermos fue posible una reducción de hasta el 60% de la dosis de corticoesteroides en los 28 días del tratamiento. El órgano afectado donde se observó un mayor grado de respuesta fue el tubo digestivo. Con una mediana de seguimiento de 11 meses, diez de los 18 pacientes estaban vivos después del tratamiento con alemtuzumab; una enfermedad crónica extensa se presentó en cuatro de los diez pacientes que sobrevivieron, cinco pacientes no mostraron nunca más datos de la enfermedad.

Observamos tasas de respuestas similares a las obtenidas con otras opciones terapéuticas, no encontramos en nuestro pequeño grupo de enfermos ningún factor que predijera la respuesta al medicamento; sin embargo, es claro que son necesarios estudios que incluyan un número más grande de pacientes para definir categóricamente la utilidad del alemtuzumab en el manejo de esta complicación.

En el año 2008 publicamos la experiencia en TCH llevados a cabo en niños menores de 18 meses de edad en el momento del trasplante.³²⁴ Nos pareció importante mostrar las características de este grupo ya que el número de lactantes trasplantados en México era muy escaso; pensamos que esto podría explicarse por considerar que los niños de esta edad suponían un riesgo adicional en el TCH. Incluimos a cinco pacientes con enfermedades diversas, realizando seis procedimientos; en cuatro trasplantes las CH se obtuvieron de unidades de SCU de donantes no emparentados y en los otros dos la fuente correspondió a la sangre periférica estimulada de donantes familiares idénticos. El acondicionamiento fue no mieloablativo en los seis procedimientos (melfalan, fludarabina y ciclofosfamida), en el segundo trasplante de la paciente con osteopetrosis se agregó al régimen globulina anti-timocito. La profilaxis para EICH fue con ciclosporina en todos los casos, unida a metotrexato en los dos de sangre periférica y en dos de sangre de cordón, y junto a esteroides en los otros dos de sangre de cordón.

La recuperación hematológica se presentó en cuatro de los cinco pacientes y no ocurrió en ninguno de los dos trasplantes de la niña con osteopetrosis. Se determinó quimerismo completo en tres enfermos, resultaron negativos en los dos trasplantes de la paciente con osteopetrosis y no se determinó en el otro caso. Tres de los cuatro pacientes en quienes se documentó prendimiento del injerto desarrollaron EICH aguda, uno de los casos fue grado IV con implicación intestinal y sin respuesta a los diferentes tratamientos utilizados, falleciendo de sepsis a los 65 días del trasplante. Tres de los cinco enfermos están actualmente vivos y libres de la enfermedad de base.

Explicado principalmente por la inmadurez del sistema inmune, los lactantes parecen tener menor grado de rechazo y de enfermedad de injerto contra huésped, además de que ha sido descrita una mejor tolerancia a los agentes quimioterapéuticos utilizados en los

regímenes de acondicionamiento; por ello, los niños en este grupo de edad no constituyen una contraindicación para el procedimiento.

En México, la carencia de un donante familiar HLA idéntico y el alto valor económico del TCH eran dos de las razones más importantes que explicaban el reducido número de pacientes trasplantados. En este grupo, solo dos de los cinco enfermos contaban con un donante HLA idéntico; sin embargo, en la actualidad, con el advenimiento de los trasplantes haploidénticos, el obstáculo de la carencia de un donante ha sido resuelto.

Ahora parece claro que los fracasos en la toma del injerto en los dos trasplantes de la niña con osteopetrosis se debieron al estado avanzado de la enfermedad de base y a las características de las unidades de sangre de cordón utilizadas, que no fueron las óptimas, tanto por la cuenta de CH como por el grado de compatibilidad. Es muy probable que, hoy en día, un paciente en condiciones similares fuese trasplantado con CH de un donante haploidéntico, así al menos la dosis de CH sería mucho mayor, incrementando la posibilidad de la toma del injerto.

A pesar de que los TCH de intensidad reducida, por ser mejor tolerados gracias a la reducción de la toxicidad aguda, fueron originalmente diseñados para pacientes de edad avanzada -o con comorbilidades que harían muy improbable una buena evolución o incluso la posibilidad de no llevar a cabo el trasplante con un régimen mieloablativo-, siempre nos pareció que este factor protector para este grupo de pacientes vulnerables debía ser trasladado también a la población pediátrica. Además, la disminución en las secuelas que ofrecen los trasplantes de intensidad reducida, cuando se comparan con aquellas que ocurren después de los tratamientos mieloablativos, es un factor adicional para considerar la posibilidad de llevar a cabo un trasplante de este tipo en los niños con indicación para un TCH, independientemente de la edad de los pacientes.

La experiencia de nuestro grupo en una patología particular fue publicada en el año 2010,³²⁵ donde reportamos los datos más importantes de ocho niños con leucemia mieloblástica aguda que fueron tratados con un TCH utilizando un régimen de intensidad reducida y, además, realizados de manera ambulatoria. Los ocho pacientes estaban en

remisión, lograda después del primer ciclo de quimioterapia y ninguno de ellos tenía un estudio citogenético favorable.

En todos los casos las CH se obtuvieron de la sangre periférica de donantes familiares idénticos. En todos los pacientes se logró un quimerismo completo. Con una mediana de seguimiento de 36 meses, la SLE fue del 87.5%.

Los resultados de este pequeño grupo de enfermos con leucemia mieloide aguda fueron excelentes, apoyando los reportes que recomiendan el TCH en todos los niños con esta enfermedad que cuenten con un donante familiar idéntico, especialmente cuando los hallazgos citogenéticos son desfavorables. Como en la mayor parte de las enfermedades, la mayor experiencia con el TCH se ha obtenido realizando trasplantes con regímenes de acondicionamiento mieloablativo, la leucemia mieloide aguda no es la excepción; sin embargo, también había muy buenos resultados obtenidos con regímenes de intensidad reducida, y este tipo de acondicionamiento ofrece algunas ventajas importantes, como son la reducción en las tasas de morbilidad y mortalidad aguda y la disminución también de las secuelas por toxicidad crónica; esta última ventaja tiene, en particular en la población pediátrica, un valor muy especial.

Finalmente, conviene mencionar que los ocho pacientes de este grupo fueron trasplantados en su primera remisión completa, es decir, no se incluyeron pacientes que ya hubieran recaído, ni mucho menos pacientes con enfermedad avanzada. Está aceptado que este debe ser uno de los factores más importantes para la obtención de los mejores resultados posibles en cualquiera de las enfermedades que tienen una indicación para un TCH. Debe remarcarse la importancia de practicar el trasplante justo cuando la indicación se establece, es decir, llevarlo a cabo cuando se deba hacer, no cuando se pueda hacer. En nuestro país, y seguramente en otros con las mismas características que el muestro, donde el factor económico es tan determinante, lo anteriormente mencionado -aunque parezca una "verdad de Perogrullo"- cobra realmente mucha importancia.

Los TCH utilizando como fuente de CH sangre placentaria constituye un grupo de pacientes muy importante, nuestra experiencia en este tipo de trasplantes fue publicada en

el año 2011.³²⁶ La rapidez con la que se encuentran y consiguen estas unidades, cuando existen en los bancos nacionales creados para esos fines o cuando se cuenta con los recursos económicos necesarios para su adquisición, además de la disminución del riesgo para desarrollar EICH hacen de esta fuente de CH una buena opción cuando no se cuenta con un donante HLA idéntico entre los familiares del enfermo. En la actualidad, el advenimiento de los trasplantes haploidénticos parece estar reduciendo su utilización.

En México, todas las publicaciones referentes a TCH son muy escasas, por ello decidimos mostrar nuestra experiencia. Incluimos de manera prospectiva los pacientes, niños y adultos, sometidos a un trasplante con sangre placentaria, como fuente de las CH, realizados a partir del año 2002 y que, teniendo la indicación para el trasplante, no contasen con un donante familiar HLA idéntico. Inicialmente la búsqueda de la unidad se llevó a cabo en nuestro país y, cuando no se encontraba, se iniciaba la búsqueda en diferentes bancos extranjeros.

El régimen mexicano de acondicionamiento de intensidad reducida fue utilizado en todos los casos, consistiendo en fludarabina, ciclofosfamida y busulfan; la prevención de la EICH se llevó a cabo con ciclosporina y metotrexato.

66 pacientes con enfermedades malignas y no neoplásicas, entre cinco meses y 72 años de edad (mediana de siete años), recibieron 79 unidades de SCU, 39 de bancos extranjeros, 33 de nacionales y 7 correspondieron a unidades de hermanos HLA idénticos. La gran mayoría correspondió a unidades con una compatibilidad de 4 o 5 de 6 antígenos.

El 44% lograron quimerismo completo, en los que ocurrió prendimiento la mediana de recuperación para neutrófilos fue de 19 días y de 22 días para plaquetas, no hubo diferencias en la tasa de prendimiento para enfermedades malignas o no neoplásicas. La mediana de supervivencia global fue de 22 meses y la supervivencia global a 36 meses fue del 32%. La incidencia acumulada para desarrollar EICH aguda grados II-IV y III-IV fue de 33% y 10%, respectivamente. Con respecto a la supervivencia global, las únicas variables favorables con diferencias estadísticamente significativas fueron la compatibilidad 6 de 6 antígenos y tener una edad menor de 15 años.

El rechazo primario en este grupo de pacientes fue considerablemente alto, nosotros lo explicamos sobre todo porque sólo el 6% de los pacientes recibieron una unidad con una compatibilidad 6 de 6 antígenos, en este pequeño porcentaje la tasa de prendimiento y la supervivencia global fueron más elevadas; de otra parte, el número reducido de CH infundidas también debe influir en este problema. De cualquier forma, el alto coste económico que significa la importación de unidades de SCU de bancos extranjeros hace que esta opción solo sea aplicable a pacientes que cuenten con seguros de gastos médicos que cubran este beneficio.

Ya ha sido mencionado el beneficio de los trasplantes de intensidad reducida, especialmente por la disminución tanto en la morbilidad y mortalidad aguda como en lo que se refiere a la presentación de secuelas a largo plazo relacionadas con los regímenes mieloablativos.

Finalmente, se percibe que con el incremento del número de trasplantes haploidénticos, los TCH de sangre placentaria quedarán reservados para casos muy particulares.

Nuestra experiencia en niños sometidos a un TCH con acondicionamiento de intensidad reducida y con donantes haploidénticos fue publicada en el año 2013.³²⁷ Hasta ahora, los mejores resultados en los TCH han sido con CH de hermanos idénticos; sin embargo, sólo uno de cada tres o cuatro pacientes que requieren un trasplante contará con un donante de estas características. Para estos enfermos, además de los trasplantes con SCU o con donantes idénticos no emparentados, otra opción, desarrollada de manera muy importante en los últimos años, es la práctica de los trasplantes haploidénticos, donde un miembro de la familia, usualmente la madre del enfermo, es la donante de las CH contando solamente con la mitad de compatibilidad en el HLA por compartir al menos un haplotipo. Los dos problemas más importantes relacionados con esta disparidad entre donante y receptor son las altas tasas de fracaso del injerto y de EICH; para solucionarlos, se han diseñado diferentes estrategias que, en general, intentan agotar o disminuir la cantidad de linfocitos T, tanto del donante como del receptor.

Presentamos la evolución de 18 niños con diversas patologías, malignas y no neoplásicas, sometidos a un TCH haploidéntico en nuestro hospital por carecer de un donante familiar HLA idéntico. Los trasplantes se realizaron entre los años 2009 y 2012 y se llevaron a cabo de manera ambulatoria.

Las CH se obtuvieron de sangre periférica estimulada de los donantes y el método empleado para el vaciado celular se basó en la utilización de microesferas recubiertas con anticuerpos anti-CD19 y anti-CD3.

Se utilizó un régimen de intensidad reducida administrado de manera ambulatoria. La mediana de edad de los donantes fue de 35 años, la madre fue la donante en 14 de los 18 trasplantes.

Hubo toma de injerto transitoria o definitivamente en 12 pacientes, tres con un quimerismo completo. En 16 pacientes se logró llevar a cabo el procedimiento de manera ambulatoria desde la administración del acondicionamiento hasta la recuperación hematológica. Se presentaron cuatro casos de EICH aguda que respondieron al tratamiento de primera o segunda línea, y hubo dos casos de EICH crónica, uno de ellos extenso que terminó en el fallecimiento de la paciente. La reconstitución inmunológica se observó en cinco pacientes, en el resto de los pacientes no se evaluó por fallecimiento o fracaso del injerto. La mortalidad relacionada con el trasplante fue del 33.3%, recayeron seis enfermos, y la supervivencia global fue de 33.3%, con una mediana de 25 meses.

Nuestros resultados no fueron los esperados, el dato más preocupante fue la alta tasa de fracasos del injerto que tuvimos. Nuestra explicación fue la dificultad técnica para obtener los mismos parámetros de retirada celular publicados con esta técnica y, tal vez, la disminución del efecto inmunosupresor debido a la administración por vía oral de fludarabina y melfalan.

Con el advenimiento de los TCH haploidénticos prácticamente ha sido resuelto el obstáculo de la carencia de un donante compatible. En México, no se cuenta con una base de donantes adultos no familiares y nuestros bancos de sangre de cordón no disponen aún de las unidades necesarias para suplir nuestras necesidades. Queda claro que es necesario

perfeccionar las técnicas de retirada celular que permitan obtener con el tiempo mejores resultados. Debemos señalar que la mayor parte de los trasplantes se pudieron realizar casi en su totalidad de manera ambulatoria, ésta práctica nos permite disminuir el coste del trasplante. Es sugerente pensar que los trasplantes ambulatorios podrían también llevarse a cabo en países desarrollados ya que, por sus condiciones generales, lo harían más llevadero para el paciente y se aprovecharían el resto de sus ventajas que son muy variadas y que ya han sido publicadas por otros autores.

Los regímenes no mieloablativos ofrecen también ventajas importantes, como son la reducción de las tasas de toxicidad aguda y la presentación de secuelas a largo plazo. Creemos que son necesarios más estudios para poder establecer el papel de cada una de las características especiales de este grupo de enfermos, de los donantes haploidénticos y los regímenes de intensidad reducida, utilizándo de manera aislada cada uno de ellos o en combinación, como es el caso de nuestra experiencia.

LOS PROBLEMAS DEL TCH EN MÉXICO

En nuestro país, como probablemente ocurra en otros países en vías de desarrollo, existen muchos problemas en todas las áreas de la salud, los TCH no son la excepción. Mencionaré las que, a mi juicio, son las principales dificultades, dejando establecido que es una opinión personal y que representa sólo mi particular punto de vista.

El problema más importante de los TCH en México es que hacemos un número muy reducido de trasplantes, mucho menor que el que debería practicarse. Por poner un ejemplo, podemos considerar el caso de España, donde en el año 2012 se practicaron 150 TCH alogénicos en menores de 15 años de edad. En ese año vivían en España siete millones de habitantes de este grupo de edad; sin embargo, ese mismo año en nuestro país llevamos a cabo aproximadamente 82 procedimientos del mismo tipo en el mismo grupo de edad, pero México tenía una población de treinta y dos millones de habitantes menores de 15 años. Esto significa que, si llevamos a cabo una comparación con España, nosotros debimos practicar 685 trasplantes, es decir, realizamos solo el 12% de los trasplantes que debíamos haber realizado. Si se acepta que la mayor parte de los pacientes que requieren un trasplante alogénico que no logran someterse al procedimiento terminan eventualmente

perdiendo la vida, significa entonces que en México fallecieron al menos en ese año poco más de 600 pacientes menores de 15 años de edad que ni siquiera pudieron ser sometidos al procedimiento.

Las razones para explicar estos números tan preocupantes son diversas, algunas corresponden a los pacientes que se diagnostican tardíamente de una enfermedad que potencialmente puede ser trasplantada, la mayor parte de las veces debido a la falta de conocimientos básicos de los médicos de primer contacto. Una vez diagnosticados y siendo candidatos potenciales a un TCH quedan bajo el cuidado de un médico especialista hematólogo, oncólogo o pediatra; no obstante, muchos de estos pacientes -aun teniendo la indicación para el trasplante- no son referidos al centro de trasplantes para su realización o, si lo son, lo hacen tardíamente, perdiendo la posibilidad de realizar el trasplante o que éste se lleve a cabo en un momento no ideal, por lo que disminuyen las posibilidades de obtener buenos resultados.

Cuando se consiguen sortear estos dos primeros obstáculos y el paciente pediátrico que requiere un trasplante se encuentra en el centro adecuado para realizarlo, pueden darse tres situaciones diferentes que hagan que el procedimiento no se logre realizar, las dos primeras ocurren en cualquier lugar del mundo, la tercera, en países como el nuestro.

En primer lugar, está completamente establecido que el buen estado general del paciente y el control de la enfermedad de base influyen positivamente en el pronóstico del trasplante; sin embargo, en ocasiones no es posible practicarlo por las malas condiciones generales del paciente y por no lograr la remisión de la enfermedad de base, frustrando de esta manera la posibilidad del TCH.

Un segundo problema, que con el tiempo tiende a ser menos importante, se refiere a la carencia de un hermano HLA compatible para fungir como donante. En la actualidad, como fuente para obtener las CH, se pueden utilizar unidades de cordón umbilical almacenadas en Bancos especialmente diseñados para estos fines; en México sin embargo, aunque contamos con varios de estos establecimientos, desafortunadamente no se dispone del número suficiente de unidades para satisfacer nuestras demandas. En cualquier caso, las

instituciones descritas están ya creadas y uno de sus objetivos principales debe ser incrementar el número de unidades disponibles. Además, en México, las bases de datos de donantes voluntarios son escasas y el número de donantes potenciales es limitado, por lo que en nuestro país los trasplantes con esta fuente de precursores hematopoyéticos son excepcionales. Con todo, el problema de la carencia de un donante compatible entre los miembros de la familia del paciente candidato a un TCH ha dejado de ser el gran problema que era hasta hace muy pocos años, debido también al resurgimiento de los trasplantes haploidénticos, que se llevan a cabo con solo la mitad de la compatibilidad requerida habitualmente, y que permiten que prácticamente todos los pacientes candidatos a un trasplante tengan entre alguno de los miembros de su familia un donante disponible.

El tercero de los obstáculos para un TCH en México es el que se refiere al alto valor económico del procedimiento y éste problema debe ser común en países como el nuestro, donde las limitaciones económicas son muchas. CA pesar de que el país cuenta con servicios de seguridad social que al menos teóricamente ofrecen la posibilidad de realizar un TCH para prácticamente toda la población, la realidad es otra, pues entre programas de trasplante limitados, trámites burocráticos lentos y procesos llenos de escollos, finalmente muchos pacientes no llegan a ser trasplantados.

El problema económico se presenta también una vez que el paciente se encuentra ya en uno de los Centros de Trasplante de nuestro país con la indicación para el TCH, con la enfermedad de base en remisión y en condiciones generales de salud aceptables, pues las determinaciones del HLA del paciente y sus hermanos resultan ser solo las primeras de las muchas erogaciones económicas que el TCH implica.

En mi opinión, países como el nuestro deben llevar a cabo investigaciones que permitan comprobar qué conductas o medicamentos son realmente necesarios y trascendentes para el curso favorable del trasplante, dejando fuera del procedimiento aquellas prácticas o medicamentos que no tengan utilidad corroborada; de esta manera, realizaremos trasplantes más económicos y, por lo tanto, podremos realizar un mayor número de ellos, sobre todo considerando el número tan reducido de trasplantes en nuestro país.

En resumen, hace falta hacer énfasis en la educación de los médicos, tanto en la escuela de medicina como en el posgrado, en la importancia del diagnóstico oportuno y del traslado a tiempo de los pacientes que se puedan beneficiar de un TCH; además, como ya fue mencionado, investigar y proponer métodos que lleven a una simplificación del procedimiento y por lo tanto a una reducción en los costes debe ser, al menos en nuestro país, una conducta generalizada de los médicos responsables de los trasplantes.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

PRIMERA. La utilización de regímenes no mieloablativos usando diferentes fuentes de progenitores en enfermedades malignas y no malignas en pediatría, puede ser una opción terapéutica según se desprende de diferentes publicaciones del autor de la presente tesis.

SEGUNDA. La realización del trasplante hematopoyético con regímenes no mieloablativos conlleva una menor mortalidad peritrasplante, así como probablemente un menor coste económico, haciendo que este procedimiento sea muy interesante en pacientes que de otro modo, no tendrían alternativa terapéutica.

RESUMEN

Se presenta una revisión general de los datos históricos más importantes y de los aspectos más trascendentes del Trasplante de Células Hematopoyéticas. Además se describe la experiencia de un Hospital Universitario en México en este campo de la Hematología en los últimos diecisiete años, especialmente enfocada a los trasplantes pediátricos donde se emplean regímenes de acondicionamiento no mieloablativos.

Se refieren los fundamentos teóricos del procedimiento, las experiencias referidas por diferentes grupos y nuestros datos publicados en diez diferentes artículos médicos, incluyendo dos reportes de casos especiales y la revisión de aspectos muy importantes, como son la práctica ambulatoria del procedimiento, la utilización de diferentes tipos de donantes -entre los que se encuentran las unidades de sangre de cordón umbilical y los donantes haploidénticos-, y el manejo terapéutico de complicaciones, como la enfermedad de injerto contra huésped.

Finalmente, se mencionan los problemas más importantes de los trasplantes en México y sus posibles soluciones.

SUMMARY

A general overview of the most important historical data and significant aspects of the Hematopoietic Cell Transplantation is described.

Experience in a University Hospital in Mexico in the field for the last seventeen years is described, especially focused on the pediatric transplant where non-myeloablative conditioning regimens are used.

The theoretical foundations of the methods related to the experiences reported by different groups and our data published in ten different medical articles, including two reports of special cases and reviewing important aspects such as out-patient basis, the use of different types of donors, including the units of umbilical cord blood and haploidentical donors and therapeutic management of complications such as graft versus host disease.

Finally the most important problems of transplants in Mexico and possible solutions to them are mentioned.

REFERENCIAS

1. **Gandemer V, Pochon C, Oger E, Dalle JH, Michel G, Schmitt C, de Berranger E, Galambrun C, Cavé H, Cayuela JM, Gardel N, Macintyre E, Margueritte G, Méchinaud F, Rorhlich P, Lutz P, Demeocq F, Schneider P, Plantaz D, Poirée M, Bordigoni P.** Clinical value of pre-transplant minimal residual disease in childhood lymphoblastic leukaemia: the results of the French minimal residual disease-guided protocol. *Br J Haematol* 2014.
2. **Doney K, Hagglund H, Leisenring W, Chauncey T, Appelbaum FR, Storb R.** Predictive factors for outcome of allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9:472-481.
3. **Anasetti C, Petersdorf EW, Martin PJ, Woolfrey A, Hansen JA.** Trends in transplantation of hematopoietic stem cells from unrelated donors. *Curr Opin Hematol* 2001;8:337-341.
4. **Fuchs EJ.** Haploidentical transplantation for hematologic malignancies: where do we stand? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:230-236.
5. **Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, Kinukawa N, Kashiwabara H, Inoko H, Yoshida T, Kimura A, Akaza T, Kamikawaji N, Kodera Y, Takaku F.** Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. Japan Marrow Donor Program. *N Engl J Med* 1998; 339:1177-1185.
6. **Hough R, Cooper N, Veys P.** Allogeneic haemopoietic stem cell transplantation in children: what alternative donor should we choose when no matched sibling is available? *Br J Haematol* 2009;147:593-613.
7. **Chan TK, Tipoe GL.** The policy statement of the American academy of pediatrics - children as hematopoietic stem cell donors - a proposal of modifications for application in the UK. *BMC Med Ethics* 2013;14:43.
8. **American Academy of Pediatrics. Committee on Bioethics.** Children as hematopoietic stem cell donors. *Pediatrics* 2010;125:392-404.
9. **Sevilla J, Diaz MA, Fernandez-Plaza S, Gonzalez-Vicent M, Madero L.** Risks and methods for peripheral blood progenitor cell collection in small children. *Transfus Apher Sci* 2004;31: 221-231.
10. **Lynch MH, Petersen FB, Appelbaum FR, Bensinger WI, Clift RA, Storb R, Sanders JE, Hansen JA, Buckner CD.** Phase II study of busulfan, cyclophosphamide and fractionated total body irradiation as a preparatory regimen for allogeneic bone marrow transplantation in patients with advanced myeloid malignancies. *Bone Marrow transplant* 1995;15:59-64.
11. **McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, Sandmaier BM, Molina AJ, Maloney DG, Chauncey TR, Gooley TA, Hegenbart U, Nash RA, Radich J, Wagner JL, Minor S, Appelbaum FR, Bensinger WI, Bryant E, Flowers ME, Georges GE, Grumet FC, Kiem HP, Torok-Storb B, Yu C, Blume KG, Storb RF.** Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood* 2001;97:3390-3400.
12. **Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, Saral R, Beschorner WE, Bias WB, Braine HG, Burns WH, Eifenbein GJ, Kaizer H.** Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclo-

- phosphamide. *N Engl J Med* 1983;309:1347-1353.
13. **Kerbaux FR, Storb R, Hegenbart U, Gooley T, Shizuru J, Al-Ali HK, Radich JP, Maloney DG, Agura E, Bruno B, Epner EM, Chauncey TR, Blume KG, Niederwieser D, Sandmaier BM.** Hematopoietic cell transplantation from HLA-identical sibling donors after low-dose radiation-based conditioning for treatment of CML. *Leukemia* 2005;19:990-997.
 14. **Giralt S, Estey E, Albitar M, van Besien K, Rondon G, Anderlini P, O'Brien S, Khouri I, Gajewski J, Mehra R, Claxton D, Andersson B, Beran M, Przepiorka D, Koller C, Kornblau S, Kørbling M, Keating M, Kantarjian H, Champlin R.** Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 1997;89:4531-4536.
 15. **Ramirez PA, Wagner JE, Brunstein CG.** Going straight to the point: intra-BM injection of hematopoietic progenitors. *Bone Marrow Transplant* 2010;45:1127-1133.
 16. **Frasconi F, Varaldo R, Gualandi F, Bacigalupo A, Sambuceti G, Sacchi N, Podestà M.** The intra-bone marrow injection of cord blood cells extends the possibility of transplantation to the majority of patients with malignant hematopoietic diseases. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010;23:237-244.
 17. **Ozcan M, Ustun C, Akcaglayan E, Akan H, Arslan O, Ilhan O, Beksaç M, Gürman G, Demirel T, Arat M, Celebi H, Konuk N, Uysal A, Koç H.** Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rh-G-CSF) may accelerate hematopoietic recovery after HLA-identical sibling allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;27:499-505.
 18. **Chang YJ, Zhao XY, Huang XJ.** Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20:440-449.
 19. **Abu-Khader A, Krause S.** Rapid monitoring of immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation--a comparison of different assays for the detection of cytomegalovirus-specific T cells. *Eur J Haematol* 2013;91:534-545.
 20. **Pérez-Martínez A, González-Vicent M, Valentín J, Aleo E, Lassaletta A, Sevilla J, Vicario JL, Ramírez M, Díaz MA.** Early evaluation of immune reconstitution following allogeneic CD3/CD19-depleted grafts from alternative donors in childhood acute leukemia. *Bone Marrow Transplant* 2012;47:1419-1427.
 21. **Seif AE, Naranjo A, Baker DL, Bunin NJ, Kletzel M, Kretschmar CS, Maris JM, McGrady PW, von Allmen D, Cohn SL, London WB, Park JR, Diller LR, Grupp SA.** A pilot study of tandem high-dose chemotherapy with stem cell rescue as consolidation for high-risk neuroblastoma: Children's Oncology Group study ANBL00P1. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:947-952.
 22. **Guilcher GM, Rizzuti FA, Lewis VA, Stewart DA.** Single-agent high-dose melphalan followed by auto-SCT for relapsed and refractory Hodgkin lymphoma in children and adolescents. *Bone Marrow Transplant* 2012;47:395-398.
 23. **Andion M, Molina B, Gonzalez-Vicent M, Alonso L, Hernandez C, Lassaletta A, López-Ibor B, Villa M, Díaz MA.** High-dose busulfan and cyclophosphamide as a conditioning regimen for autologous peripheral blood stem cell transplantation in childhood non-Hodgkin lymphoma patients: a long-

- term follow-up study. *J Pediatr Hematol Oncol* 2011;33:e89-91.
24. Kreissman SG, Seeger RC, Matthay KK, London WB, Sposto R, Grupp SA, Haas-Kogan DA, Laquaglia MP, Yu AL, Diller L, Buxton A, Park JR, Cohn SL, Maris JM, Reynolds CP, Villablanca JG. Purged versus non-purged peripheral blood stem-cell transplantation for high-risk neuroblastoma (COG A3973): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013;14:999-1008.
 25. Benjamin JE, Chen GL, Cao TM, Cao PD, Wong RM, Sheehan K, Shizuru JA, Johnston LJ, Negrin RS, Lowsky R, Laport GG. Long-term follow-up of patients with diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma receiving purged autografts after induction failure. *Bone Marrow Transplant* 2010;45:303-309.
 26. Shaughnessy P, Islas-Ohlmayer M, Murphy J, Hougham M, MacPherson J, Winkler K, Silva M, Steinberg M, Matous J, Selvey S, Maris M, McSweeney PA. Cost and clinical analysis of autologous hematopoietic stem cell mobilization with G-CSF and plerixafor compared to G-CSF and cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:729-736.
 27. Bakanay SM, Demirer T. Novel agents and approaches for stem cell mobilization in normal donors and patients. *Bone Marrow Transplant* 2012;47:1154-1163.
 28. Fruehauf S. Current Clinical Indications for Plerixafor. *Transfus Med Hemother* 2013;40:246-250.
 29. Moog R. Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006;1:189-201.
 30. Haspel RL, Miller KB. Hematopoietic stem cells: source matters. *Curr Stem Cell Res Ther* 2008;3:229-236.
 31. Gerull S, Stern M, Apperley J, Beelen D, Brinch L, Bunjes D, Butler A, Ganser A, Ghavamzadeh A, Koh MB, Komarnicki M, Kröger N, Maertens J, Maschan A, Peters C, Rovira M, Sengeløv H, Socié G, Tischer J, Oneto R, Passweg J, Marsh J. Syngeneic transplantation in aplastic anemia: pre-transplant conditioning and peripheral blood are associated with improved engraftment: an observational study on behalf of the Severe Aplastic Anemia and Pediatric Diseases Working Parties of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica* 2013; 98:1804-1809.
 32. Thomas ED, Storb R. Technique for human marrow grafting. *Blood* 1970; 36:507-515.
 33. Diaz MA, Sevilla J, de la Rubia J, Verdeguer A, Espigado I, Vicent MG, Pascual MJ, Zamora C, Arrieta R, Serrano D, del Cañizo C, Arbona C, de Arriba F, Bargay J, Brunet S, Sanz MA. Factors predicting peripheral blood progenitor cell collection from pediatric donors for allogeneic transplantation. *Haematologica* 2003;88:919-922.
 34. Pierelli L, Perseghin P, Marchetti M, Accorsi P, Fanin R, Messina C, Olivieri A, Risso M, Salvaneschi L, Bosi A; Società Italiana Di Emaferesi and Manipolazione Cellulare (SIDEM); Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). Best practice for peripheral blood progenitor cell mobilization and collection in adults and children: results of a Società Italiana Di Emaferesi e Manipolazione Cellulare (SIDEM) and Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO) consensus process. *Transfusion* 2012;52:893-905.
 35. Oran B, Shpall E. Umbilical cord blood transplantation: a maturing technology. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:215-222.

36. **Van Besien K, Liu H, Jain N, Stock W, Artz A.** Umbilical cord blood transplantation supported by third-party donor cells: rationale, results, and applications. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:682-691.
37. **Aznar Lucea J.** Umbilical cord blood banks. Ethical aspects. Public versus private banks. *Cuad Bioet* 2012;23:269-85.
38. **Walter RB, Gooley TA, Wood BL, Milano F, Fang M, Sorrow ML, Estey EH, Salter AI, Lansverk E, Chien JW, Gopal AK, Appelbaum FR, Pagel JM.** Impact of pretransplantation minimal residual disease, as detected by multiparametric flow cytometry, on outcome of myeloablative hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2011;29:1190-1197.
39. **Marsh RA, Vaughn G, Kim MO, Li D, Jodele S, Joshi S, Mehta PA, Davies SM, Jordan MB, Bleasing JJ, Filipovich AH.** Reduced-intensity conditioning significantly improves survival of patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2010;116:5824-5831.
40. **Bernardo ME, Piras E, Vacca A, Giorgiani G, Zecca M, Bertaina A, Pagliara D, Contoli B, Pinto RM, Caocci G, Mastronuzzi A, La Nasa G, Locatelli.** Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia major: results of a reduced-toxicity conditioning regimen based on the use of treosulfan. *Blood* 2012;120:473-476.
41. **Ljungman P, Urbano-Ispizua A, Cavazzana-Calvo M, Demirer T, Dini G, Einsele H, Gratwohl A, Madrigal A, Niederwieser D, Passweg J, Rocha V, Saccardi R, Schouten H, Schmitz N, Socie G, Sureda A, Apperley J; European Group for Blood and Marrow.** Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant* 2006;37:439-449.
42. **Gratwohl A, Baldomero H, Passweg J.** Hematopoietic stem cell transplantation activity in Europe. *Curr Opin Hematol* 2013;20:485-493.
43. **Gratwohl A, Baldomero H, Gratwohl M, Aljurf M, Bouzas LF, Horowitz M, Kodera Y, Lipton J, Iida M, Pasquini MC, Passweg J, Szer J, Madrigal A, Frauendorfer K, Niederwieser D; Worldwide Network of Blood and Marrow Transplantation (WBMT).** Quantitative and qualitative differences in use and trends of hematopoietic stem cell transplantation: a Global Observational Study. *Haematologica* 2013;98:1282-1290.
44. **Gratwohl A, Baldomero H, Aljurf M, Pasquini MC, Bouzas LF, Yoshimi A, Szer J, Lipton J, Schwendener A, Gratwohl M, Frauendorfer K, Niederwieser D, Horowitz M, Kodera Y; Worldwide Network of Blood and Marrow Transplantation.** Hematopoietic stem cell transplantation: a global perspective. *JAMA* 2010;303:1617-1624.
45. **Kelly MJ, Horan JT, Alonzo TA, Eapen M, Gerbing RB, He W, Lange BJ, Parsons SK, Woods WG.** Comparable survival for pediatric acute myeloid leukemia with poor-risk cytogenetics following chemotherapy, matched related donor, or unrelated donor transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 2014;61:269-275.
46. **Burke MJ, Wagner JE, Cao Q, Ustun C, Verneris MR.** Allogeneic hematopoietic cell transplantation in first remission abrogates poor outcomes associated with high-risk pediatric acute myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:1021-1025.

47. Copelan EA, Hamilton BK, Avalos B, Ahn KW, Bolwell BJ, Zhu X, Aljurf M, van Besien K, Bredeson C, Cahn JY, Costa LJ, de Lima M, Gale RP, Hale GA, Halter J, Hamadani M, Inamoto Y, Kamble RT, Litzow MR, Loren AW, Marks DI, Olavarria E, Roy V, Sabloff M, Savani BN, Seftel M, Schouten HC, Ustun C, Waller EK, Weisdorf DJ, Wirk B, Horowitz MM, Arora M, Szer J, Cortes J, Kalaycio ME, Maziarz RT, Saber W. Better leukemia-free and overall survival in AML in first remission following cyclophosphamide in combination with busulfan compared with TBI. *Blood* 2013;122:3863-3870.
48. Duval M, Klein JP, He W, Cahn JY, Cairo M, Camitta BM, Kamble R, Copelan E, de Lima M, Gupta V, Keating A, Lazarus HM, Litzow MR, Marks DI, Maziarz RT, Rizzieri DA, Schiller G, Schultz KR, Tallman MS, Weisdorf D. Hematopoietic stem-cell transplantation for acute leukemia in relapse or primary induction failure. *J Clin Oncol* 2010; 28:3730-3738.
49. Ishaqi MK, Afzal S, Dupuis A, Doyle J, Gassas A. Outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for children with acute myelogenous leukemia in second complete remission: single center experience. *Pediatr Transplant* 2009;13:999-1003.
50. Balduzzi A, Valsecchi MG, Uderzo C, De Lorenzo P, Klingebiel T, Peters C, Stary J, Felice MS, Magyarosy E, Conter V, Reiter A, Messina C, Gadner H, Schrappe M. Chemotherapy versus allogeneic transplantation for very-high-risk childhood acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission: comparison by genetic randomisation in an international prospective study. *Lancet* 2005;366:635-642.
51. Schrauder A, Reiter A, Gadner H, Niethammer D, Klingebiel T, Kremens B, Peters C, Ebell W, Zimmermann M, Niggli F, Ludwig WD, Riehm H, Welte K, Schrappe M. Superiority of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation compared with chemotherapy alone in high-risk childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: results from ALL-BFM 90 and 95. *J Clin Oncol* 2006;24:5742-5749.
52. Salami K, Alkayed K, Halalsheh H, Hussein AA, Riziq M, Madanat F. Hematopoietic stem cell transplant versus chemotherapy plus tyrosine kinase inhibitor in the treatment of pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2013;6:34-41.
53. Yamada K, Yasui M, Kondo O, Sato M, Sawada A, Kawa K, Inoue M. Feasibility of reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation with imatinib in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60:E60-62.
54. Hamidieh AA, Ansari S, Darbandi B, Soroush A, Arjmandi Rafsanjani K, Alimoghaddam K, Bahosh G, Behfar M, Ghavamzadeh A. The treatment of children suffering from chronic myelogenous leukemia: a comparison of the result of treatment with imatinib mesylate and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Transplant* 2013;17:380-386.
55. Andolina JR, Neudorf SM, Corey SJ. How I treat childhood CML. *Blood* 2012;119:1830.
56. Gao L, Gao L, Gong Y, Zhang C, Chen XH, Zhang X. Reduced-intensity conditioning therapy with fludarabine, idarubicin, busulfan and cytarabine for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2013;37:1482-1487.

57. Marsh JC, Pearce RM, Koh MB, Lim Z, Pagliuca A, Mufti GJ, Perry J, Snowden JA, Vora AJ, Wynn RT, Russell N, Gibson B, Gilleece M, Milligan D, Veys P, Samarasinghe S, McMullin M, Kirkland K, Cook G; **British Society for Blood and Marrow Transplantation, Clinical Trials Committee**. Retrospective study of alemtuzumab vs ATG-based conditioning without irradiation for unrelated and matched sibling donor transplants in acquired severe aplastic anemia: a study from the British Society for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2014;49(1):42-48.
58. George B, Mathews V, Viswabandya A, Kavitha ML, Srivastava A, Chandy M. Fludarabine based reduced intensity conditioning regimens in children undergoing allogeneic stem cell transplantation for severe aplastic anemia. *Pediatr Transplant* 2008;12:14-19.
59. La Nasa G, Caocci G, Efficace F, Dessi C, Vacca A, Piras E, Sanna M, Marcias M, Littera R, Carcassi C, Lucarelli G. Long-term health-related quality of life evaluated more than 20 years after hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia. *Blood* 2013;122:2262-2270.
60. Matthes-Martin S, Lawitschka A, Fritsch G, Lion T, Grimm B, Breuer S, Boztug H, Karlhuber S, Holter W, Peters C, Minkov M. Stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning for sickle cell disease. *Eur J Haematol* 2013;90:308-312.
61. Gungor T, Teira P, Slatter M, Stussi G, Stepensky P, Moshous D, Vermont C, Ahmad I, Shaw PJ, Telles da Cunha JM, Schlegel PG, Hough R, Fasth A, Kentouche K, Gruhn B, Fernandes JF, Lachance S, Bredius R, Resnick IB, Belohradsky BH, Gennery A, Fischer A, Gaspar HB, Schanz U, Seger R, Rentsch K, Veys P, Haddad E, Albert MH, Hassan M; **Inborn Errors Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation**. Reduced-intensity conditioning and HLA-matched haemopoietic stem-cell transplantation in patients with chronic granulomatous disease: a prospective multicentre study. *Lancet* 2014;383:436-448.
62. Mitchell R, Nivison-Smith I, Anazodo A, Tiedemann K, Shaw P, Teague L, Fraser C, Carter T, Tapp H, Alvaro F, O'Brien TA. Outcomes of hematopoietic stem cell transplantation in primary immunodeficiency: a report from the Australian and New Zealand Children's Haematology Oncology Group and the Australasian Bone Marrow Transplant Recipient Registry. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19(3):338-343.
63. Triplett BM, Wang C, Yang J, Dallas M, Hartford C, Howard V, Pillai A, Shook D, Srinivasan A, Laver J, Leung W. Effects of conditioning regimens and T cell depletion in hematopoietic cell transplantation for primary immune deficiency. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;18:1911-1920.
64. Gjertson DW. Revisiting the center effect. *Clin Transpl* 2005:333-341.
65. Klingebiel T, Cornish J, Labopin M, Locatelli F, Darbyshire P, Handgretinger R, Balduzzi A, Owoc-Lempach J, Fagioli F, Or R, Peters C, Aversa F, Polge E, Dini G, Rocha V; **Pediatric Diseases and Acute Leukemia Working Parties of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT)**. Results and factors influencing outcome after fully haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in children with very high-risk acute lymphoblastic leukemia: impact of center size: an analysis on behalf of the Acute Leukemia and Pediatric Disease Working Parties of the European Blood and Marrow Transplant group. *Blood* 2010;115:3437-3446.

66. Kollman C, Abella E, Baitty RL, Beatty PG, Chakraborty R, Christiansen CL, Hartzman RJ, Hurley CK, Milford E, Nyman JA, Smith TJ, Switzer GE, Wada RK, Setterholm M. Assessment of optimal size and composition of the U.S. National Registry of hematopoietic stem cell donors. *Transplantation* 2004; 78:89-95.
67. Switzer GE, Bruce JG, Myaskovsky L, DiMartini A, Shellmer D, Confer DL, Abress LK, King RJ, Harnaha AG, Ohngemach S, Dew MA. Race and ethnicity in decisions about unrelated hematopoietic stem cell donation. *Blood* 2013;121:1469-1476.
68. Johansen KA, Schneider JF, McCaffree MA, Woods GL; Council on Science and Public Health, AMA. Efforts of the United States' National Marrow Donor Program and Registry to improve utilization and representation of minority donors. *Transfus Med* 2008; 18:250-259.
69. Locatelli F, Rocha V, Chastang C, Arcese W, Michel G, Abecasis M, Messina C, Ortega J, Badell-Serra I, Plouvier E, Souillet G, Jouet JP, Pasquini R, Ferreira E, Garnier F, Gluckman E. Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. Eurocord-Cord Blood Transplant Group. *Blood* 1999;93:3662-3671.
70. Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood* 2013;122:491-498.
71. Querol S, Rubinstein P, Marsh SG, Goldman J, Madrigal JA. Cord blood banking: 'providing cord blood banking for a nation'. *Br J Haematol* 2009; 147:227-235.
72. Parco S, Vascotto F, Visconti P. Public banking of umbilical cord blood or storage in a private bank: testing social and ethical policy in northeastern Italy. *J Blood Med* 2013;4:23-29.
73. Barker JN, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation: current state of the art. *Curr Opin Oncol* 2002;14:160-164.
74. Butler MG, Menitove JE. Umbilical cord blood banking: an update. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:669-676.
75. Garcia J. Allogeneic unrelated cord blood banking worldwide: an update. *Transfus Apher Sci* 2010;42:257-263.
76. Yoder MC. Cord blood banking and transplantation: advances and controversies. *Curr Opin Pediatr* 2014;26:163-168.
77. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, Goldman A, Kersey J, Krivit W, MacMillan ML, Orchard PJ, Peters C, Weisdorf DJ, Ramsay NK, Davies SM. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002;100:1611-1618.
78. Migliaccio AR, Adamson JW, Stevens CE, Dobrila NL, Carrier CM, Rubinstein P. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood* 2000; 96:2717-2722.
79. Wallet HL, Sobh M, Morisset S, Robin M, Fegueux N, Furst S, Mohty M, Deconinck E, Fouillard L, Bordigoni P, Rio B, Sirvent A, Renaud M, Dhedin N, Tabrizi R, Maury S, Buzyn A, Michel G, Maillard N, Cahn JY, Bay JO, Yakoub-Agha I, Huynh A, Schmidt-Tanguy A, Lamy T, Lioure B, Raus N, Marry E, Garnier F, Balère ML, Gluckman E, Rocha V, Socié G, Blaise D, Milpied N, Michallet M. Double umbilical cord

- blood transplantation for hematological malignancies: a long-term analysis from the SFGM-TC registry. *Exp Hematol* 2013;41:924-933.
80. **Ostronoff F, Milano F, Gooley T, Gutman JA, McSweeney P, Petersen FB, Sandmaier BM, Storb R, Delaney C.** Double umbilical cord blood transplantation in patients with hematologic malignancies using a reduced-intensity preparative regimen without anti-thymocyte globulin. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:782-786.
 81. **Broder SM, Ponsaran RS, Goldenberg AJ.** US public cord blood banking practices: recruitment, donation, and the timing of consent. *Transfusion* 2013;53:679-687.
 82. **Solves P, Perales A, Fillol M, Bonilla-Musoles F, Mirabet V.** Cord blood quality after vaginal and cesarean deliveries. *Transfusion* 2012;52:2064-2066.
 83. **Page KM, Mendizabal A, Betz-Stablein B, Wease S, Shoulars K, Gentry T, Prasad VK, Sun J, Carter S, Balber AE, Kurtzberg J.** Optimizing donor selection for public cord blood banking: influence of maternal, infant, and collection characteristics on cord blood unit quality. *Transfusion* 2014;54:340-352.
 84. **Allan D, Petraszko T, Elmoazzen H, Smith S.** A review of factors influencing the banking of collected umbilical cord blood units. *Stem Cells Int* 2013; 2013:463031.
 85. **Keersmaekers CL, Mason BA, Keersmaekers J, Ponzini M, Mlynarek RA.** Factors affecting umbilical cord blood stem cell suitability for transplantation in an in utero collection program. *Transfusion* 2014;54:545-549.
 86. **Mancinelli F, Tamburini A, Spagnoli A, Malerba C, Suppo G, Lasorella R, de Fabritiis P, Calugi A.** Optimizing umbilical cord blood collection: impact of obstetric factors versus quality of cord blood units. *Transplant proc* 2006;38:1174-1176.
 87. **Aversa F, Tabilio A, Velardi A, Cunningham I, Terenzi A, Falzetti F, Ruggeri L, Barbabietola G, Aristei C, Latini P, Reisner Y, Martelli MF.** Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med* 1998;339:1186-1193.
 88. **Lang P, Handgretinger R.** Haploidentical SCT in children: an update and future perspectives. *Bone Marrow Transplant* 2008;42 Suppl:S54-59.
 89. **Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, Del Papa B, Zei T, Ostini RI, Cecchini D, Aloisi T, Perruccio K, Ruggeri L, Balucani C, Pierini A, Sportoletti P, Aristei C, Falini B, Reisner Y, Velardi A, Aversa F, Martelli MF.** Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 2011;117:3921-3928.
 90. **Booth C, Lawson S, Veys P.** The current role of T cell depletion in paediatric stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2013;162:177-190.
 91. **Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ.** Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp Hematol* 2001;29:259-277.
 92. **Ferrara JL, Yanik G.** Acute graft versus host disease: pathophysiology, risk factors, and prevention strategies. *Clin Adv Hematol Oncol* 2005;3:415-419, 428.
 93. **Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen J, Gratwohl A, Vogelsang GB, van Houwelingen HC, van Rood JJ.** 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* 1996; 334:281-285.
94. **Tseng LH, Lin MT, Hansen JA, Gooley T, Pei J, Smith AG, Martin EG, Petersdorf EW, Martin PJ.** Correlation between disparity for the minor histocompatibility antigen HA-1 and the development of acute graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1999;94:2911-2914.
 95. **Atkinson K, Farrell C, Chapman G, Downs K, Penny R, Biggs J.** Female marrow donors increase the risk of acute graft-versus-host disease: effect of donor age and parity and analysis of cell subpopulations in the donor marrow inoculum. *Br J Haematol* 1986;63:231-239.
 96. **Koc H, Gurman G, Arslan O, Ozcan M, Dilek I, Akan H, Ilhan O, Konuk N, Beksaç M, Uysal A.** Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: is there an increased risk of graft vs host disease in leukemia patients? *J Chemother* 1997;9:371-376.
 97. **Ishida T, Hishizawa M, Kato K, Tanosaki R, Fukuda T, Takatsuka Y, Eto T, Miyazaki Y, Hidaka M, Uike N, Miyamoto T, Tsudo M, Sakamaki H, Morishima Y, Suzuki R, Utsunomiya A.** Impact of graft-versus-host disease on allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T cell leukemia-lymphoma focusing on preconditioning regimens: nationwide retrospective study. *Biol blood marrow transplant* 2013;19(12):1731-1739.
 98. **Baron F, Labopin M, Niederwieser D, Vigouroux S, Cornelissen JJ, Malm C, Vindelov LL, Blaise D, Janssen JJ, Petersen E, Socié G, Nagler A, Rocha V, Mohty M.** Impact of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: a report from the Acute Leukemia Working Party of the European group for blood and marrow transplantation. *Leukemia* 2012;26: 2462-2468.
 99. **Flowers ME, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem HP, Petersdorf EW, Pereira SE, Nash RA, Mielcarek M, Fero ML, Warren EH, Sanders JE, Storb RF, Appelbaum FR, Storer BE, Martin PJ.** 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* 2011; 117:3214-3219.
 100. **Couriel D, Caldera H, Champlin R, Komanduri K.** Acute graft-versus-host disease: pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Cancer* 2004;101:1936-1946.
 101. **Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, Thomas ED.** 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:825-828.
 102. **Martino R, Romero P, Subira M, Bellido M, Altes A, Sureda A, Brunet S, Badell I, Cubells J, Sierra J.** Comparison of the classic Glucksberg criteria and the IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease following HLA-identical sibling stem cell transplantation. International Bone Marrow Transplant Registry. *Bone Marrow Transplant* 1999;24:283-287.
 103. **Sanz J, Picardi A, Hernandez Boluda JC, Martin C, Ferrá C, Nozzoli C, Gonzalez-Vicent M, Rambaldi A, Valcarcel D, Verdeguer A, Serrano D, de Heredia CD, Pascual MJ, de Paz R, Montesinos P, Bartolozzi B, Algarotti A, Sanz MA, Arcese W, Sanz GF; GETH and GITMO.** Impact of graft-versus-host disease prophylaxis on outcomes after myeloablative single-unit umbilical cord blood transplantation. *Biol Blood*

- Marrow Transplant* 2013;19:1387-1392.
104. **McNeil C.** Preventing graft-versus-host disease: transplanters glimpse hope beyond immunosuppressants. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:922-923.
 105. **Martin PJ, Hansen JA, Storb R, Thomas ED.** T cell depletion of donor marrow for prevention of acute graft-versus-host disease. *Haematol Blood Transfus* 1985;29:42-43.
 106. **Novitzky N, Thomas V, Hale G, Waldmann H.** Ex vivo depletion of T cells from bone marrow grafts with CAMPATH-1 in acute leukemia: graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. *Transplantation* 1999; 67:620-626.
 107. **Cragg L, Blazar BR, Defor T, Kolatker N, Miller W, Kersey J, Ramsay M, McGlave P, Filipovich A, Weisdorf D.** A randomized trial comparing prednisone with antithymocyte globulin/prednisone as an initial systemic therapy for moderately severe acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000;6:441-447.
 108. **Van Lint MT, Milone G, Leotta S, Uderzo C, Scime R, Dallorso S, Locasciulli A, Guidi S, Mordini N, Sica S, Cudillo L, Fagioli F, Selleri C, Bruno B, Arcese W, Bacigalupo A.** Treatment of acute graft-versus-host disease with prednisolone: significant survival advantage for day +5 responders and no advantage for nonresponders receiving anti-thymocyte globulin. *Blood* 2006; 107:4177-4181.
 109. **Kim SS.** Treatment options in steroid-refractory acute graft-versus-host disease following hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Pharmacother* 2007;41:1436-1444.
 110. **Couriel D, Saliba R, Hicks K, Ippoliti C, de Lima M, Hosing C, Khouri I, Andersson B, Gajewski J, Donato M, Anderlini P, Kontoyiannis DP, Cohen A, Martin T, Giralt S, Champlin R.** Tumor necrosis factor-alpha blockade for the treatment of acute GVHD. *Blood* 2004;104:649-654.
 111. **Bolanos-Meade J, Jacobsohn DA, Margolis J, Ogden A, Wientjes MG, Byrd JC, Lucas DM, Anders V, Phelps M, Grever MR, Vogelsang GB.** Pentostatin in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *J Clin Oncol* 2005;23:2661-2668.
 112. **Hockenbery DM, Cruickshank S, Rodell TC, Gooley T, Schuening F, Rowley S, David D, Brunvand M, Berryman B, Abhyankar S, Bouvier M, McDonald GB.** A randomized, placebo-controlled trial of oral beclomethasone dipropionate as a prednisone-sparing therapy for gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood* 2007; 109:4557-4563.
 113. **Krenger W, Ferrara JL.** Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm. *Immunol Res* 1996;15:50-73.
 114. **Filipovich AH.** Diagnosis and manifestations of chronic graft-versus-host disease. *Best Pract Res Clin Haematol* 2008;21:251-257.
 115. **Zecca M, Prete A, Rondelli R, Lanino E, Balduzzi A, Messina C, Fagioli F, Porta F, Favre C, Pession A, Locatelli F; AIEOP-BMT Group. Italian Association for Pediatric Hematology and Oncology-Bone Marrow Transplant.** Chronic graft-versus-host disease in children: incidence, risk factors, and impact on outcome. *Blood* 2002;100(4):1192-1200.
 116. **Jacobsohn DA, Arora M, Klein JP, Hasebroek A, Flowers ME, Cutler CS, Urbano-Ispizua A, Bolwell BJ, Antin JH, Boyiadzis M, Cahn JY, Cairo MS, Herzig RH, Isola LM, Klumpp TR, Lee SJ, Petersdorf EW, Santarone S, Gale RP, Schouten HC, Spellman SR, Weisdorf**

- DJ, Wingard JR, Horowitz MM, Pavletic S. Risk factors associated with increased nonrelapse mortality and with poor overall survival in children with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2011;118:4472-4479.
117. Akpek G, Zahurak ML, Piantadosi S, Margolis J, Doherty J, Davidson R, Vogelsang GB. Development of a prognostic model for grading chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2001;97:1219-1226.
118. Marks C, Stadler M, Hausermann P, Wolff D, Buchholz S, Stary G, Lee S, Lawitschka A, Bertz H. German-Austrian-Swiss Consensus Conference on clinical practice in chronic graft-versus-host disease (GVHD): guidance for supportive therapy of chronic cutaneous and musculoskeletal GVHD. *Br J Dermatol* 2011;165:18-29.
119. Weitz M, Strahm B, Meerpohl JJ, Bassler D. Extracorporeal photopheresis versus alternative treatment for chronic graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation in paediatric patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 2:CD009898.
120. Gonzalez Vicent M, Ramirez M, Sevilla J, Abad L, Diaz MA. Analysis of clinical outcome and survival in pediatric patients undergoing extracorporeal photopheresis for the treatment of steroid-refractory GVHD. *J Pediatr Hematol Oncol* 2010;32:589-593.
121. Barker CC, Anderson RA, Sauve RS, Butzner JD. GI complications in pediatric patients post-BMT. *Bone Marrow Transplant* 2005;36:51-58.
122. Goldberg J, Jacobsohn DA, Zahurak ML, Vogelsang GB. Gastrointestinal toxicity from the preparative regimen is associated with an increased risk of graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:101-107.
123. Uchida M, Kato K, Ikesue H, Ichinose K, Hiraiwa H, Sakurai A, Muta T, Takenaka K, Iwasaki H, Miyamoto T, Teshima T, Shiratsuchi M, Suetsugu K, Nagata K, Egashira N, Akashi K, Oishi R. Efficacy and safety of aprepitant in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pharmacotherapy* 2013;33: 893-901.
124. Vagliano L, Feraut C, Gobetto G, Trunfio A, Errico A, Campani V, Costazza G, Mega A, Matozzo V, Berni M, Alberani F, Banfi MM, Martinelli L, Munaron S, Orlando L, Lubiato L, Leanza S, Guerrato R, Rossetti A, Messina M, Barzetti L, Satta G, Dimonte V. Incidence and severity of oral mucositis in patients undergoing haematopoietic SCT--results of a multicentre study. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:727-732.
125. Hernandez-Fernandez A, Onate-Sanchez RE, Cabrerizo-Merino MC, de Arriba-de la-Fuente F, Heras-Fernando I, Vicente-Garcia V. Influence of oral health on mucositis in patients undergoing hematopoietic progenitor cell transplantation (HPCT). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012;17:e94-e101.
126. Sakiyama M, Kami M, Hori A, Imataki O, Hamaki T, Murashige N, Kobayashi K, Kishi Y, Kojima R, Kim SW, Kusumi E, Yuji K, Miyakoshi S, Mori S, Tanosaki R, Taniguchi S, Takaue Y; Tokyo SCT Consortium. Regimen-related toxicity following reduced-intensity stem-cell transplantation (RIST): comparison between Seattle criteria and National Cancer Center Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) version 2.0. *Bone Marrow Transplant* 2004;34:787-794.
127. Raber-Durlacher JE, von Bultzingslowen I, Logan RM, Bowen J, Al-Azri AR, Everaus H, Gerber E, Gomez JG, Pettersson BG, Soga Y, Spijkervet FK, Tissing WJ, Epstein JB, Elad S, Lalla RV; Mucositis Study Group of the

- Multinational Association of Supportive Care in Cancer/ International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO).** Systematic review of cytokines and growth factors for the management of oral mucositis in cancer patients. *Support Care Cancer* 2013;21:343-355.
128. **Badell I, EBMT Paediatric Working Party.** Cytokines following SCT: indications and controversies. *Bone Marrow Transplant* 2008;41 Suppl 2: S27-29.
129. **Beaven AW, Shea TC.** Recombinant human keratinocyte growth factor palifermin reduces oral mucositis and improves patient outcomes after stem cell transplant. *Drugs Today (Barc)* 2007;43:461-473.
130. **Liu D, Yan C, Xu L, Wang Y, Han W, Zhang X, Liu K, Huang X.** Diarrhea during the conditioning regimen is correlated with the occurrence of severe acute graft-versus-host disease through systemic release of inflammatory cytokines. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:1567-1575.
131. **Willems E, Baron F, Seidel L, Frere P, Fillet G, Beguin Y.** Comparison of thrombotic microangiopathy after allogeneic hematopoietic cell transplantation with high-dose or non-myeloablative conditioning. *Bone Marrow Transplant* 2010;45:689-693.
132. **Ribaud P, Gluckman E.** Hepatic veno-occlusive disease. *Pediatr transplant* 1999;3 (Suppl 1):41-44.
133. **Lee SH, Yoo KH, Sung KW, Koo HH, Kwon YJ, Kwon MM, Park HJ, Park BK, Kim YY, Park JA, Im HJ, Seo JJ, Kang HJ, Shin HY, Ahn HS.** Hepatic veno-occlusive disease in children after hematopoietic stem cell transplantation: incidence, risk factors, and outcome. *Bone Marrow Transplant* 2010;45:1287-1293.
134. **Park M, Park HJ, Eom HS, Kwon YJ, Park JA, Lim YJ, Yoon JH, Kong SY, Ghim TT, Lee HW, Yun T, Park BK.** Safety and effects of prophylactic defibrotide for sinusoidal obstruction syndrome in hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Transplant* 2013; 18:36-42.
135. **Richardson PG, Soiffer RJ, Antin JH, Uno H, Jin Z, Kurtzberg J, Martin PL, Steinbach G, Murray KF, Vogelsang GB, Chen AR, Krishnan A, Kernan NA, Avigan DE, Spitzer TR, Shulman HM, Di Salvo DN, Revta C, Warren D, Momtaz P, Bradwin G, Wei LJ, Iacobelli M, McDonald GB, Guinan EC.** Defibrotide for the treatment of severe hepatic veno-occlusive disease and multiorgan failure after stem cell transplantation: a multicenter, randomized, dose-finding trial. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:1005-1017.
136. **Gorczyńska E, Turkiewicz D, Rybka K, Toporski J, Kalwak K, Dyla A, Szczyra Z, Chybicka A.** Incidence, clinical outcome, and management of virus-induced hemorrhagic cystitis in children and adolescents after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:797-804.
137. **Kloos RQ, Boelens JJ, de Jong TP, Versluys B, Bierings M.** Hemorrhagic cystitis in a cohort of pediatric transplantations: incidence, treatment, outcome, and risk factors. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:1263-1266.
138. **Laskin BL, Denburg M, Furth S, Diorio D, Goebel J, Davies SM, Jodele S.** BK viremia precedes hemorrhagic cystitis in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:1175-1182.

139. Haines HL, Laskin BL, Goebel J, Davies SM, Yin HJ, Lawrence J, Mehta PA, Bleesing JJ, Filipovich AH, Marsh RA, Jodele S. Blood, and not urine, BK viral load predicts renal outcome in children with hemorrhagic cystitis following hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:1512-1519.
140. Miyagawa-Hayashino A, Sonobe M, Kubo T, Yoshizawa A, Date H, Manabe T. Non-specific interstitial pneumonia as a manifestation of graft-versus-host disease following pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pathol Int* 2010;60:137-142.
141. Majhail NS, Parks K, Defor TE, Weisdorf DJ. Diffuse alveolar hemorrhage and infection-associated alveolar hemorrhage following hematopoietic stem cell transplantation: related and high-risk clinical syndromes. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:1038-1046.
142. Dvorak CC, Gracia CR, Sanders JE, Cheng EY, Baker KS, Pulsipher MA, Petryk A. NCI, NHLBI/PBMTC first international conference on late effects after pediatric hematopoietic cell transplantation: endocrine challenges—thyroid dysfunction, growth impairment, bone health, & reproductive risks. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:1725-1738.
143. Kim SJ, Choi JM, Kim JE, Cho BK, Kim DW, Park HJ. Clinicopathologic characteristics of cutaneous chronic graft-versus-host diseases: a retrospective study in Korean patients. *Int J Dermatol* 2010;49:1386-1392.
144. Tabbara KF, Al-Ghamdi A, Al-Mohareb F, Ayas M, Chaudhri N, Al-Sharif F, Al-Zahrani H, Mohammed SY, Nassar A, Aljurf M. Ocular findings after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ophthalmology* 2009;116:1624-1629.
145. Malta JB, Soong HK, Shtein RM, Musch DC, Rhoades W, Sugar A, Mian SI. Treatment of ocular graft-versus-host disease with topical cyclosporine 0.05%. *Cornea* 2010;29:1392-1396.
146. O'Brien TA, Eastlund T, Peters C, Neglia JP, Defor T, Ramsay NK, Scott Baker K. Autoimmune haemolytic anaemia complicating haematopoietic cell transplantation in paediatric patients: high incidence and significant mortality in unrelated donor transplants for non-malignant diseases. *Br J Haematol* 2004;127:67-75.
147. Gunn ML, Godwin JD, Kanne JP, Flowers ME, Chien JW. High-resolution CT findings of bronchiolitis obliterans syndrome after hematopoietic stem cell transplantation. *J Thorac Imaging* 2008;23:244-250.
148. Radhakrishnan K, Bishop J, Jin Z, Kothari K, Bhatia M, George D, Garvin JH Jr, Martinez M, Ovchinsky N, Lobritto S, Elsayed Y, Satwani P. Risk factors associated with liver injury and impact of liver injury on transplantation-related mortality in pediatric recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:912-917.
149. Savani BN, Koklanaris EK, Le Q, Shenoy A, Goodman S, Barrett AJ. Prolonged chronic graft-versus-host disease is a risk factor for thyroid failure in long-term survivors after matched sibling donor stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:377-381.
150. Sanders JE, Guthrie KA, Hoffmeister PA, Woolfrey AE, Carpenter PA, Appelbaum FR. Final adult height of patients who received hematopoietic cell transplantation in childhood. *Blood* 2005;105:1348-1354.
151. Couto-Silva AC, Trivin C, Esperou H, Michon J, Baruchel A, Lemaire P,

- Brauner R. Final height and gonad function after total body irradiation during childhood. *Bone Marrow Transplant* 2006;38:427-432.
152. Vatanen A, Wilhelmsson M, Borgstrom B, Gustafsson B, Taskinen M, Saarinen-Pihkala UM, Winiarski J, Jahnukainen K. Ovarian function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in childhood and adolescence. *Eur J Endocrinol* 2013;170:211-218.
153. Tichelli A, Rovo A. Fertility issues following hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol* 2013;6:375-388.
154. Alonso Riofrio R, Villa Asensi JR, Sequeiros Gonzalez A, Diaz Perez MA, Gonzalez Vicent M, Madero Lopez L. Obstructive lung disease after allogeneic stem cell transplantation in children. *An Pediatr (Barc)* 2004;61:124-130.
155. Fahnehjelm KT, Tornquist AL, Olsson M, Winiarski J. Visual outcome and cataract development after allogeneic stem-cell transplantation in children. *Acta Ophthalmol Scand* 2007;85:724-733.
156. Daikeler T, Mauramo M, Rovo A, Stern M, Halter J, Buser A, Tyndall A, Häusermann P, Gratwohl A, Tichelli A, Brennan MT, Waltimo T. Sicca symptoms and their impact on quality of life among very long-term survivors after hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2013;48:988-993.
157. Sharma S, Leung WH, Deqing P, Yang J, Rochester R, Britton L, Neel MD, Ness KK, Kaste S. Osteonecrosis in children after allogeneic hematopoietic cell transplantation: study of prevalence, risk factors and longitudinal changes using MR imaging. *Bone Marrow Transplant* 2012;47:1067-1074.
158. Styczynski J, Gil L, Tridello G, Ljungman P, Donnelly JP, van der Velden W, Omar H, Martino R, Halkes C, Faraci M, Theunissen K, Kalwak K, Hubacek P, Sica S, Nozzoli C, Fagioli F, Matthes S, Diaz MA, Migliavacca M, Balduzzi A, Tomaszewska A, Camara Rde L, van Biezen A, Hoek J, Iacobelli S, Einsele H, Cesaro S; Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow. Response to rituximab-based therapy and risk factor analysis in epstein barr virus-related lymphoproliferative disorder after hematopoietic stem cell transplant in children and adults: a study from the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Clin Infect Dis* 2013; 57:794-802.
159. Fisher BT, Alexander S, Dvorak CC, Zaoutis TE, Zerr DM, Sung L. Epidemiology and potential preventive measures for viral infections in children with malignancy and those undergoing hematopoietic cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 2012;59:11-15.
160. Boyce JM, Pittet D; Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee; HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HIPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *American J Infect Control* 2002;30:S1-46.
161. Cecinati V, Principi N, Brescia L, Esposito S. Antibiotic prophylaxis in children with cancer or who have undergone hematopoietic cell transplantation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:1-6.
162. Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, Boeckh MJ, Ito JI, Mullen CA, Raad II, Rolston KV, Young JA, Wingard JR, Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in

- neutropenic patients with cancer: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2011;52:427-431.
163. Kamboj M, Chung D, Seo SK, Pamer EG, Sepkowitz KA, Jakubowski AA, Papanicolaou G. The changing epidemiology of vancomycin-resistant Enterococcus (VRE) bacteremia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:1576-1581.
164. Vydra J, Shanley RM, George I, Ustun C, Smith AR, Weisdorf DJ, Young JA. Enterococcal bacteremia is associated with increased risk of mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2012;55:764-770.
165. Maertens J, Marchetti O, Herbrecht R, Cornely OA, Fluckiger U, Frere P, Gachot B, Heinz WJ, Lass-Flörl C, Ribaud P, Thiebaut A, Cordonnier C; Third European Conference on Infections in Leukemia. European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3--2009 update. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:709-718.
166. Marr KA, Crippa F, Leisenring W, Hoyle M, Boeckh M, Balajee SA, Nichols WG, Musher B, Corey L. Itraconazole versus fluconazole for prevention of fungal infections in patients receiving allogeneic stem cell transplants. *Blood* 2004;103:1527-1533.
167. Omer AK, Ziakas PD, Anagnostou T, Coughlin E, Kourkoumpetis T, McAfee SL, Dey BR, Attar E, Chen YB, Spitzer TR, Mylonakis E, Ballen KK. Risk factors for invasive fungal disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single center experience. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:1190-1196.
168. Fortun J, Carratala J, Gavalda J, Lizasoain M, Salavert M, de la Camara R, Borges M, Cervera C, Garnacho J, Lassaleta Á, Lumbreras C, Sanz MÁ, Ramos JT, Torre-Cisneros J, Aguado JM, Cuenca-Estrella M; Grupo de Estudio de Micología Médica de la SEIMC (GEMICOMED). Guidelines for the treatment of invasive fungal disease by Aspergillus spp. and other fungi issued by the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). 2011 Update. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29:435-454.
169. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2011;52:750-770.
170. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005;5:609-622.
171. Bollee G, Sarfati C, Thierry G, Bergeron A, de Miranda S, Menotti J, de Castro N, Tazi A, Schlemmer B, Azoulay E. Clinical picture of Pneumocystis jiroveci pneumonia in cancer patients. *Chest* 2007;132:1305-1310.
172. Sangiolo D, Storer B, Nash R, Corey L, Davis C, Flowers M, Hackman RC, Boeckh M. Toxicity and efficacy of daily dapsone as Pneumocystis jiroveci prophylaxis after hematopoietic stem cell transplantation: a case-control study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:521-529.
173. Maschmeyer G, Beinert T, Buchheidt D, Cornely OA, Einsele H, Heinz W, Heussel CP, Kahl C, Kiehl M, Lorenz J, Hof H, Mattiuzzi G. Diagnosis and antimicrobial therapy of lung infiltrates in febrile neutropenic patients: Guidelines of the infectious diseases working party of the German Society of

- Haematology and Oncology. *Eur J Cancer* 2009;45:2462-2472.
174. **Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G, Rubin R, Wingard JR, Zaia J.** Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9:543-558.
 175. **Boeckh M, Ljungman P.** How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 2009; 113:5711-5719.
 176. **Bacigalupo A, Boyd A, Slipper J, Curtis J, Clissold S.** Foscarnet in the management of cytomegalovirus infections in hematopoietic stem cell transplant patients. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012;10:1249-1264.
 177. **Gaziev J, Paba P, Miano R, Germani S, Sodani P, Bove P, Perno CF, Marziali M, Gallucci C, Isgrò A, Paciaroni K, Roveda A, Simone MD, De Angelis G, Alfieri C, Lucarelli G.** Late-onset hemorrhagic cystitis in children after hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia and sickle cell anemia: a prospective evaluation of polyoma (BK) virus infection and treatment with cidofovir. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:662-671.
 178. **Gala-Lopez BL, Senior PA, Koh A, Kashkoush SM, Kawahara T, Kin T, Humar A, Shapiro AM.** Late cytomegalovirus transmission and impact of T-depletion in clinical islet transplantation. *Am J Transplant* 2011;11:2708-2714.
 179. **Jacobson LO, Marks EK, Gaston EO.** Effect of protection of the spleen during total body irradiation on the blood in rabbit. *Rev Hematol* 1953;8:515-532.
 180. **Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E.** Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 1951; 12:197-201.
 181. **Barnes DW, Loutit JF.** What is the recovery factor in spleen. *Nucleonics* 1954;12:4.
 182. **Main JM, Prehn RT.** Successful skin homografts after the administration of high dosage X radiation and homologous bone marrow. *J Natl Cancer Inst* 1955;15:1023-1029.
 183. **Trentin JJ.** Mortality and skin transplantability in x-irradiated mice receiving isologous, homologous or heterologous bone marrow. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956;92:688-693.
 184. **Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE.** Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J* 1956;2:626-627.
 185. **Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW.** Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med* 1957;257:491-496.
 186. **Bortin MM.** A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation* 1970;9:571-587.
 187. **Kurnick NB, Montano A, Gerdes JC, Feder BH.** Preliminary observations on the treatment of postirradiation hematopoietic depression in man by the infusion of stored autogenous bone marrow. *Ann Intern Med* 1958;49:973-986.
 188. **McGovern JJ Jr, Russell PS, Atkins L, Webster EW.** Treatment of terminal leukemic relapse by total-body irradiation and intravenous infusion of stored autologous bone marrow obtained during remission. *N Engl J Med* 1959;260:675-683.
 189. **Haurani FI.** Thirty-one-year survival following chemotherapy and autologous bone marrow in malignant

- lymphoma. *Am J Hematol* 1997;55:35-38.
190. **Thomas ED, Lochte HL Jr, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW.** Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* 1959;38:1709-1716.
191. **Mathe G, Jammet H, Pendic B, Schwarzenberg L, Duplan JF, Maupin B, Latarjet R, Larrieu MJ, Kalic D, Djukic Z.** Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation. *Rev Fr Etud Clin Biol* 1959;4:226-238.
192. **Andrews GA.** Criticality accidents in Vinca, Yugoslavia, and Oak Ridge, Tennessee. Comparison of radiation injuries and results of therapy. *JAMA* 1962;179:191-197.
193. **Billingham RE, Brent L, Medawar PB.** Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953;172:603-606.
194. **Billingham RE, Brent L.** Quantitative studies on tissue transplantation immunity. IV. Induction of tolerance in newborn mice and studies on the phenomenon of runt disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1959;242:1.
195. **Billingham RE.** The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey lect* 1966;62:21-78.
196. Radiation Chimaeras [press release]. 1967.
197. **Uphoff DE.** Genetic factors influencing irradiation protection by bone marrow. I. The F1 hybrid effect. *J Natl Cancer Inst* 1957;19:123-130.
198. **Uphoff DE.** Alteration of homograft reaction by A-methopterin in lethally irradiated mice treated with homologous marrow. *Proc Soc Exp Biol Med* 1958;99:651-653.
199. **Lochte HL Jr, Levy AS, Guenther DM, Thomas ED, Ferrebee JW.** Prevention of delayed foreign marrow reaction in lethally irradiated mice by early administration of methotrexate. *Nature* 1962;196:1110-1111.
200. **Barnes DW, Loutit JF.** The radiation recovery factor: preservation by the Polge-Smith-Parkes technique. *J Natl Cancer Inst* 1955;15:901-905.
201. **Cavins JA, Kasakura S, Thomas ED, Ferrebee JW.** Recovery of lethally irradiated dogs following infusion of autologous marrow stored at low temperature in dimethylsulphoxide. *Blood* 1962;20:730-734.
202. **Cavins JA, Scheer SC, Thomas ED, Ferrebee JW.** The recovery of lethally irradiated dogs given infusions of autologous leukocytes preserved at -80 C. *Blood* 1964;23:38-42.
203. **Thomas ED, Ashley CA, Lochte HL Jr, Jaretzki A 3rd, Sahler OD, Ferrebee JW.** Homografts of bone marrow in dogs after lethal total-body radiation. *Blood* 1959;14:720-736.
204. **Thomas ED, Collins JA, Herman EC Jr, Ferrebee JW.** Marrow transplants in lethally irradiated dogs given methotrexate. *Blood* 1962;19:217-228.
205. **Dausset J.** Iso-leuko-antibodies. *Acta Haematol* 1958;20:156-166.
206. **Van Rood JJ, Eernisse JG, Van Leeuwen A.** Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* 1958;181:1735-1736.
207. **Storb R, Epstein RB, Bryant J, Ragde H, Thomas ED.** Marrow grafts by combined marrow and leukocyte infusions in unrelated dogs selected by histocompatibility typing. *Transplantation* 1968;6:587-593.
208. **Storb R, Rudolph RH, Thomas ED.** Marrow grafts between canine siblings matched by serotyping and mixed leukocyte culture. *J Clin Invest* 1971;50:1272-1275.

209. **Storb R, Epstein RB, Graham TC, Thomas ED.** Methotrexate regimens for control of graft-versus-host disease in dogs with allogeneic marrow grafts. *Transplantation* 1970;9:240-246.
210. **Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA.** Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968;2:1366-1369.
211. **Bach FH, Albertini RJ, Joo P, Anderson JL, Bortin MM.** Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* 1968; 2:1364-1366.
212. **De Koning J, Van Bekkum DW, Dicke KA, Dooren LJ, Radl J, Van Rood JJ.** Transplantation of bone-marrow cells and fetal thymus in an infant with lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1969;1:1223-1227.
213. **Buckner CD, Epstein RB, Rudolph RH, Clift RA, Storb R, Thomas ED.** Allogeneic marrow engraftment following whole body irradiation in a patient with leukemia. *Blood* 1970; 35:741-750.
214. **Thomas ED, Storb R, Fefer A, Slichter SJ, Bryant JI, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Funk DD, Lerner KE.** Aplastic anaemia treated by marrow transplantation. *Lancet* 1972;1:284-289.
215. **Santos GW, Sensenbrenner LL, Burke PJ, Colvin M, Owens AH Jr, Bias WB, Slavin RE.** Marrow transplantation in man following cyclophosphamide. *Transplant Proc* 1971;3:400-404.
216. **Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson L, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD.** Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:895-902.
217. **Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, Clift RA, Fefer A, Flournoy N, Goodell BW, Hickman RO, Lerner KG, Neiman PE, Sale GE, Sanders JE, Singer J, Stevens M, Storb R, Weiden PL.** One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1977;49:511-533.
218. **Thomas ED, Flournoy N, Buckner CD.** Cure of leukemia by marrow transplantation. *Leuk Res* 1977;1:4.
219. **Thomas ED, Buckner CD, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, Sale GE, Sanders JE, Singer JW, Shulman H, Storb R, Weiden PL.** Marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia in first remission. *N Engl J Med* 1979;301:597-599.
220. **Blume KG, Beutler E.** Allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia. *JAMA* 1979;241:1686.
221. **Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M.** Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Res* 1965;25:1525-1531.
222. **Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, Storb R.** Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 1979;300:1068-1073.
223. **Hansen JA, Clift RA, Thomas ED, Buckner CD, Storb R, Giblett ER.** Transplantation of marrow from an unrelated donor to a patient with acute leukemia. *N Engl J Med* 1980;303:565-567.
224. **Powles RL, Barrett AJ, Clink H, Kay HE, Sloane J, McElwain TJ.** Cyclosporin A for the treatment of graft-versus-host disease in man. *Lancet* 1978;2:1327-1331.
225. **Powles RL, Clink HM, Spence D, Morgenstern G, Watson JG, Selby PJ, Woods M, Barrett A, Jameson B, Sloane J, Lawler SD.** Cyclosporin A to

- prevent graft-versus-host disease in man after allogeneic bone-marrow transplantation. *Lancet* 1980;1:327-329.
226. **Calne RY, Rolles K, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Henderson RG, Aziz S, Lewis P.** Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet* 1979;2:1033-1036.
227. **Selby PJ, Powles RL, Janeson B, Kay HE, Watson JG, Thornton R, Morgenstern G, Clink HM, McElwain TJ, Prentice HG, Corringharn R, Ross MG, Hoffbrand AV, Brigden D.** Parenteral acyclovir therapy for herpesvirus infections in man. *Lancet* 1979;2:1267-1270.
228. **Medoff G, Dismukes WE, Meade RH 3rd, Moses JM.** A new therapeutic approach to Candida infections. A preliminary report. *Arch Intern Med* 1972;130:241-245.
229. **Emanuel D, Cunningham I, Jules-Elysee K, Brochstein JA, Kernan NA, Laver J, Stover D, White DA, Fels A, Polsky B.** Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation successfully treated with the combination of ganciclovir and high-dose intravenous immune globulin. *Ann Intern Med* 1988;109:777-782.
230. **Lopez-Berestein G, Fainstein V, Hopfer R, Mehta K, Sullivan MP, Keating M, Rosenblum MG, Mehta R, Luna M, Hersh EM.** Liposomal amphotericin B for the treatment of systemic fungal infections in patients with cancer: a preliminary study. *J Infect Dis* 1985; 151:704-710.
231. **Goldman JM, Cleaver S, Warren P.** World Marrow Donor Association: a progress report. *Bone Marrow Transplant* 1994;13:689-691.
232. **Kingston JE, Malpas JS, Stiller CA, Pritchard J, McElwain TJ.** Autologous bone marrow transplantation contributes to haemopoietic recovery in children with solid tumours treated with high dose melphalan. *Br J Haematol* 1984;58:589-595.
233. **Lazarus HM, Herzig RH, Graham-Pole J, Wolff SN, Phillips GL, Strandjord S, Hurd D, Forman W, Gordon EM, Coccia P.** Intensive melphalan chemotherapy and cryopreserved autologous bone marrow transplantation for the treatment of refractory cancer. *J Clin Oncol* 1983;1:359-367.
234. **Brito-Babapulle F, Bowcock SJ, Marcus RE, Apperley J, Th'ng KH, Dowding C, Rassool F, Guo AP, Catovsky D, Galton DA.** Autografting for patients with chronic myeloid leukaemia in chronic phase: peripheral blood stem cells may have a finite capacity for maintaining haemopoiesis. *Br J Haematol* 1989; 73:76-81.
235. **Treleaven JG, Gibson FM, Ugelstad J, Rembaum A, Philip T, Caine GD, Kemshead JT.** Removal of neuroblastoma cells from bone marrow with monoclonal antibodies conjugated to magnetic microspheres. *Lancet* 1984;1:70-73.
236. **Powles R, Smith C, Milan S, Treleaven J, Millar J, McElwain T, Gordon-Smith E, Milliken S, Tiley C.** Human recombinant GM-CSF in allogeneic bone-marrow transplantation for leukaemia: double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 1990;336:1417-1420.
237. **Gluck S, des Rochers C, Cano C, Dorreen M, Germond C, Gill K, Lopez P, Sinoff C.** High-dose chemotherapy followed by autologous blood cell transplantation: a safe and effective outpatient approach. *Bone Marrow Transplant* 1997;20:431-434.
238. **Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie**

- G, Lehn P.** Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321:1174-1178.
239. **Gluckman E.** European organization for cord blood banking. *Blood Cells* 1994;20:601-608.
240. **Fisher CA.** Establishment of cord blood bank for use in stem cell transplantation: comentary *Curr Probl Obstet Gynecol Fertil* 1996;19:4.
241. **Perales MA, Ishill N, Lomazow WA, Weinstock DM, Papadopoulos EB, Dastagir H, Chiu M, Boulad F, Castro-Malaspina HR, Heller G, Jakubowski AA, O'Reilly RJ, Small TN, Young JW, Kernan NA.** Long-term follow-up of patients treated with daclizumab for steroid-refractory acute graft-vs-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:481-486.
242. **Bordigoni P, Dimicoli S, Clement L, Baumann C, Salmon A, Witz F, Feugier P.** Daclizumab, an efficient treatment for steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 2006;135:382-385.
243. **Jacobsohn DA, Hallick J, Anders V, McMillan S, Morris L, Vogelsang GB.** Infliximab for steroid-refractory acute GVHD: a case series. *Am J Hematol* 2003;74(2):119-124.
244. **Barrett AJ, Malkovska V.** Graft-versus-leukaemia: understanding and using the alloimmune response to treat haematological malignancies. *Br J Haematol* 1996;93:754-761.
245. **Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, Varadi G, Kirschbaum M, Ackerstein A, Samuel S, Amar A, Brautbar C, Ben-Tal O, Eldor A, Or R.** Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cyto-reduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 1998;91:756-763.
246. **Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA.** Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 2006;314:126-129.
247. **Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, Glimm H, Kühlcke K, Schilz A, Kunkel H, Naundorf S, Brinkmann A, Deichmann A, Fischer M, Ball C, Pilz I, Dunbar C, Du Y, Jenkins NA, Copeland NG, Lüthi U, Hassan M, Thrasher AJ, Hoelzer D, von Kalle C, Seger R, Grez M.** Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 2006;12:401-409.
248. **Gale RP, Kay HE, Rimm AA, Bortin MM.** Bone-marrow transplantation for acute leukaemia in first remission. *Lancet* 1982;2:1006-1009.
249. **Powles RL, Milliken S, Helenglass G, Treleavan J, Pinkerton R, Zuiable A, Nandi A, Abound H, Millar J.** The use of melphalan in conjunction with total body irradiation as treatment for acute leukaemia. *Transplant Proc* 1989;21): 2955-2957.
250. **Blume KG, Forman SJ, O'Donnell MR, Doroshow JH, Krance RA, Nademanee AP, Snyder DS, Schmidt GM, Fahey JL, Metter GE.** Total body irradiation and high-dose etoposide: a new preparatory regimen for bone marrow transplantation in patients with advanced hematologic malignancies. *Blood* 1987;69:1015-1020.

251. **Weaver CH, Petersen FB, Appelbaum FR, Bensinger WI, Press O, Martin P, Sandmaier B, Deeg HJ, Hansen JA, Brunvand M.** High-dose fractionated total-body irradiation, etoposide, and cyclophosphamide followed by autologous stem-cell support in patients with malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 1994;12:2559-2566.
252. **Zander AR, Culbert S, Jagannath S, Spitzer G, Keating M, Larry N, Cockerill K, Hester J, Horwitz L, Vellekoop L.** High dose cyclophosphamide, BCNU, and VP-16 (CBV) as a conditioning regimen for allogeneic bone marrow transplantation for patients with acute leukemia. *Cancer* 1987;59:1083-1086.
253. **Clift RA, Radich J, Appelbaum FR, Martin P, Flowers ME, Deeg HJ, Storb R, Thomas Ed.** Long-term follow-up of a randomized study comparing cyclophosphamide and total body irradiation with busulfan and cyclophosphamide for patients receiving allogeneic marrow transplants during chronic phase of chronic myeloid leukemia. *Blood* 1999;94:3960-3962.
254. **Devergie A, Blaise D, Attal M, Tigaud JD, Jouet JP, Vernant JP, Bordigoni P, Ifrah N, Dauriac C, Cahn JY.** Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia in first chronic phase: a randomized trial of busulfan-cytosine versus cytosine-total body irradiation as preparative regimen: a report from the French Society of Bone Marrow Graft (SFGM). *Blood* 1995;85:2263-2268.
255. **Radich JP, Gooley T, Bensinger W, Chauncey T, Clift R, Flowers M, Martin P, Slattery J, Sultan D, Appelbaum FR.** HLA-matched related hematopoietic cell transplantation for chronic-phase CML using a targeted busulfan and cyclophosphamide preparative regimen. *Blood* 2003;102:31-35.
256. **Gocheva LB.** Nonmyeloablative conditioning regimens and bone marrow transplantation--some contemporary aspects. *Folia Med (Plovdiv)* 2010;52:12-17.
257. **Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, Ortega J, Souillet G, Ferreira E, Laporte JP, Fernandez M, Chastang C.** Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med* 1997;337:373-381.
258. **Giralt S, Thall PF, Khouri I, Wang X, Braunschweig I, Ippolitti C, Claxton D, Donato M, Bruton J, Cohen A, Davis M, Andersson BS, Anderlini P, Gajewski J, Kornblau S, Andreeff M, Przepiorka D, Ueno NT, Molldrem J, Champlin R.** Melphalan and purine analog-containing preparative regimens: reduced-intensity conditioning for patients with hematologic malignancies undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Blood* 2001;97:631-637.
259. **Spitzer TR, McAfee S, Sackstein R, Colby C, Toh HC, Multani P, Saidman S, Weyouth DW, Preffer F, Poliquin C, Foley A, Cox B, Andrews D, Sachs DH, Sykes M.** Intentional induction of mixed chimerism and achievement of antitumor responses after nonmyeloablative conditioning therapy and HLA-matched donor bone marrow transplantation for refractory hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000;6:309-320.
260. **Bacigalupo A.** Third EBMT/AMGEN Workshop on reduced-intensity conditioning allogeneic haemopoietic stem cell transplants (RIC-HSCT), and panel consensus. *Bone Marrow transplant* 2004;33:691-696.

261. **Slavin S, Naparstek E, Nagler A, Ackerstein A, Kapelushnik J, Or R.** Allogeneic cell therapy for relapsed leukemia after bone marrow transplantation with donor peripheral blood lymphocytes. *Exp hematol* 1995;23:1553-1562.
262. **Slavin S, Naparstek E, Nagler A, Ackerstein A, Samuel S, Kapelushnik J, Brautbarc, Or R.** Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996;87:2195-2204.
263. **Collins RH Jr, Shpilberg O, Drobyski WR, Porter DL, Giralto S, Champlin R, Goodman SA, Wolff SN, Hu W, Verfaillie C, List A, Dalton W, Ognoskie N, Chetrit A, Antin JH, Nemunaitis J.** Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1997;15:433-444.
264. **Naparstek E, Or R, Nagler A, Cividalli G, Engelhard D, Aker M, Gimon Z, Manny N, Sacks T, Tochner Z.** T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation for acute leukaemia using Campath-1 antibodies and post-transplant administration of donor's peripheral blood lymphocytes for prevention of relapse. *Br J Haematol* 1995;89:506-515.
265. **Santos GW.** History of bone marrow transplantation. *Clin Haematol* 1983;12:611-639.
266. **Forkner CE.** Leukemia and Allied Disorders. New York: Macmillan NY, 1938.
267. **Champlin R, Khouri I, Kornblau S, Molldrem J, Giralto S.** Reinventing bone marrow transplantation: reducing toxicity using nonmyeloablative, preparative regimens and induction of graft-versus-malignancy. *Curr Opin Oncol* 1999;11:87-95.
268. **Dini G, Cancedda R, Locatelli F, Bosi A, Bandini G, Alessandrino EP, Porta F, Uderzo C, Messina C, Fagioli F, Arcese W, Marengo P, Fanin R, Falda M, Soligo D, La Nasa G, Giardini C, Pession A, Scimè R, Di Bartolomeo P, Bruno B, Garbarino L, Lamparelli T, Giorgiani G, Lanino E, Manzitti C, Bacigalupo A; Italian Bone Marrow Transplant Group (GITMO).** Unrelated donor marrow transplantation: an update of the experience of the Italian Bone Marrow Group (GITMO). *Haematologica* 2001;86:451-456.
269. **Rondon G, Giralto S, Huh Y, Khouri I, Andersson B, Andreeff M, Champlin R.** Graft-versus-leukemia effect after allogeneic bone marrow transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1996;18:669-72.
270. **Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermueller J, de Witte T, Holler E, Ansari H; European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia.** Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 1995;86:2041-2050.
271. **Slavin S, Strober S, Fuks Z, Kaplan HS.** Induction of specific tissue transplantation tolerance using fractionated total lymphoid irradiation in adult mice: long-term survival of allogeneic bone marrow and skin grafts. *J Exp Med* 1977;146:34-48.
272. **Del Toro G, Satwani P, Harrison L, Cheung YK, Brigid Bradley M, George D, Yamashiro DJ, Garvin J, Skerrett D, Bessmertny O, Wolownik K, Wischhover C, van de Ven C, Cairo MS.** A pilot study of reduced intensity conditioning and allogeneic stem cell

- transplantation from unrelated cord blood and matched family donors in children and adolescent recipients. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:613-622.
273. Shenoy S, Grossman WJ, DiPersio J, Yu LC, Wilson D, Barnes YJ, Mohanakumar T, Rao A, Hayashi RJ. A novel reduced-intensity stem cell transplant regimen for nonmalignant disorders. *Bone Marrow Transplant* 2005;35:345-352.
274. Sullivan KM, Weiden PL, Storb R, Witherspoon RP, Fefer A, Fisher L, Buckner CD, Anasetti C, Appelbaum FR, Badger C. Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia. *Blood* 1989;73:1720-1728.
275. Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R, Thomas ED. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med* 1981;304:1529-1533.
276. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringdén O, Rozman C, Speck B. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75(3):555-562.
277. Goldman JM, Gale RP, Horowitz MM, Biggs JC, Champlin RE, Gluckman E, Hoffmann RG, Jacobsen SJ, Marmont AM, McGlave PB. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med* 1988;108:806-814.
278. Gale RP, Horowitz MM, Ash RC, Champlin RE, Goldman JM, Rimm AA, Ringdén O, Stone JA, Bortin MM. Identical-twin bone marrow transplants for leukemia. *Ann Intern Med* 1994;120:646-652.
279. Sorror ML, Maris MB, Sandmaier BM, Storer BE, Stuart MJ, Hegenbart U, Agura E, Chauncey TR, Leis J, Pulsipher M, McSweeney P, Radich JP, Bredeson C, Bruno B, Langston A, Loken MR, Al-Ali H, Blume KG, Storb R, Maloney DG. Hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning for advanced chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23:3819-3829.
280. Devine SM, Hoffman R, Verma A, Shah R, Bradlow BA, Stock W, Maynard V, Jessop E, Peace D, Huml M, Thomason D, Chen YH, van Besien K. Allogeneic blood cell transplantation following reduced-intensity conditioning is effective therapy for older patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2002;99:2255-2258.
281. Khouri IF, Saliba RM, Giralt SA, Lee MS, Okoroji GJ, Hagemester FB, Korbling M, Younes A, Ippoliti C, Gajewski JL, McLaughlin P, Anderlini P, Donato ML, Cabanillas FF, Champlin RE. Nonablative allogeneic hematopoietic transplantation as adoptive immunotherapy for indolent lymphoma: low incidence of toxicity, acute graft-versus-host disease, and treatment-related mortality. *Blood* 2001;98:3595-3599.
282. Kroger N, Schwerdtfeger R, Kiehl M, Sayer HG, Renges H, Zabelina T, Fehse B, Tögel F, Wittkowsky G, Kuse R, Zander AR. Autologous stem cell transplantation followed by a dose-reduced allograft induces high complete remission rate in multiple myeloma. *Blood* 2002;100:755-760.
283. Carella AM, Cavaliere M, Lerma E, Ferrara R, Tedeschi L, Romanelli A, Vinci M, Pinotti G, Lambelet P, Loni C, Verdiani S, De Stefano F, Valbonesi M, Corsetti MT. Autografting followed by

- nonmyeloablative immunosuppressive chemotherapy and allogeneic peripheral-blood hematopoietic stem-cell transplantation as treatment of resistant Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2000;18:3918-3924.
284. **Maloney DG, Molina AJ, Sahebi F, Stockerl-Goldstein KE, Sandmaier BM, Bensinger W, Storer B, Hegenbart U, Somlo G, Chauncey T, Bruno B, Appelbaum FR, Blume KG, Forman SJ, McSweeney P, Storb R.** Allografting with nonmyeloablative conditioning following cytoreductive autografts for the treatment of patients with multiple myeloma. *Blood* 2003;102:3447-3454.
285. **de Lima M, Anagnostopoulos A, Munsell M, Shahjahan M, Ueno N, Ippoliti C, Andersson BS, Gajewski J, Couriel D, Cortes J, Donato M, Neumann J, Champlin R, Giralt S.** Nonablative versus reduced-intensity conditioning regimens in the treatment of acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome: dose is relevant for long-term disease control after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2004;104:865-872.
286. **Alyea EP, Kim HT, Ho V, Cutler C, Gribben J, DeAngelo DJ, Lee SJ, Windawi S, Ritz J, Stone RM, Antin JH, Soiffer RJ.** Comparative outcome of nonmyeloablative and myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for patients older than 50 years of age. *Blood* 2005;105:1810-1814.
287. **Scott BL, Sandmaier BM, Storer B, Maris MB, Sorrow ML, Maloney DG, Chauncey TR, Storb R, Deeg HJ.** Myeloablative vs nonmyeloablative allogeneic transplantation for patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukemia with multilineage dysplasia: a retrospective analysis. *Leukemia* 2006;20:128-135.
288. **Burroughs L, Mielcarek M, Leisenring W, Sandmaier BM, Maloney DG, Baron F, Martin PJ, Flowers ME, Forman SJ, Chauncey TR, Bruno B, Storb R.** Extending postgrafting cyclosporine decreases the risk of severe graft-versus-host disease after nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation. *Transplantation* 2006;81:818-825.
289. **Baron F, Maris MB, Sandmaier BM, Storer BE, Sorrow M, Diaconescu R, Woolfrey AE, Chauncey TR, Flowers ME, Mielcarek M, Maloney DG, Storb R.** Graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol* 2005;23:1993-2003.
290. **Aoudjhane M, Labopin M, Gorin NC, Shimoni A, Ruutu T, Kolb HJ, Frassoni F, Boiron JM, Yin JL, Finke J, Shouten H, Blaise D, Falda M, Fauser AA, Esteve J, Polge E, Slavin S, Niederwieser D, Nagler A, Rocha V; Acute Leukemia Working Party (ALWP) of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT).** Comparative outcome of reduced intensity and myeloablative conditioning regimen in HLA identical sibling allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for patients older than 50 years of age with acute myeloblastic leukaemia: a retrospective survey from the Acute Leukemia Working Party (ALWP) of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Leukemia* 2005;19:2304-2312.
291. **Ringden O, Erkers T, Aschan J, Garming-Legert K, Le Blanc K, Hagglund H, Omazic B, Svenberg P, Dahllöf G, Mattsson J, Ljungman P, Remberger M.** A prospective randomized toxicity study to compare reduced-intensity and

- myeloablative conditioning in patients with myeloid leukaemia undergoing allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *J Intern Med* 2013;274:153-162.
292. **Childs R, Bahceci E, Clave E, Van Rhee F, Jayasekera D, Mayo G.** Non-myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplants (PBSCT) for malignant diseases reduces transplant-related mortality (TRM) *Blood* 1998;92(Suppl).
293. **Perez-Simon JA, Kottaridis PD, Martino R, Craddock C, Caballero D, Chopra R, García-Conde J, Milligan DW, Schey S, Urbano-Ispizua A, Parker A, Leon A, Yong K, Sureda A, Hunter A, Sierra J, Goldstone AH, Linch DC, San Miguel JF, Mackinnon S; Spanish and United Kingdom Collaborative Groups for Nonmyeloablative Transplantation.** Nonmyeloablative transplantation with or without alemtuzumab: comparison between 2 prospective studies in patients with lymphoproliferative disorders. *Blood* 2002;100:3121-3127.
294. **Iannone R, Casella JF, Fuchs EJ, Chen AR, Jones RJ, Woolfrey A, Amylon M, Sullivan KM, Storb RF, Walters MC.** Results of minimally toxic nonmyeloablative transplantation in patients with sickle cell anemia and beta-thalassemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9:519-528.
295. **Jacobsohn DA, Duerst R, Tse W, Kletzel M.** Reduced intensity haemopoietic stem-cell transplantation for treatment of non-malignant diseases in children. *Lancet* 2004;364:156-162.
296. **Duerst R.** Efficacy of RIC with FLU-BU-ATG and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for pediatric ALL. *Blood* 2004;104:2314.
297. **Roman E, Cooney E, Harrison L, Militano O, Wolownik K, Hawks R, Foley S, Satwani P, Unal E, Bhatia M, Bradley B, Del Toro G, George D, Garvin J, van de Ven C, Cairo MS.** Preliminary results of the safety of immunotherapy with gemtuzumab ozogamicin following reduced intensity allogeneic stem cell transplant in children with CD33+ acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2005;11:7164s-7170s.
298. **Amrolia P, Gaspar HB, Hassan A, Webb D, Jones A, Sturt N, Mieli-Vergani G, Pagliuca A, Mufti G, Hadzic N, Davies G, Veys P.** Nonmyeloablative stem cell transplantation for congenital immunodeficiencies. *Blood* 2000;96:1239-1246.
299. **Rao K, Amrolia PJ, Jones A, Cale CM, Naik P, King D, Davies GE, Gaspar HB, Veys PA.** Improved survival after unrelated donor bone marrow transplantation in children with primary immunodeficiency using a reduced-intensity conditioning regimen. *Blood* 2005;105:879-885.
300. **Slatter MA, Rao K, Amrolia P, Flood T, Abinun M, Hambleton S, Nademi Z, Goulden N, Davies G, Qasim W, Gaspar HB, Cant A, Gennery AR, Veys P.** Treosulfan-based conditioning regimens for hematopoietic stem cell transplantation in children with primary immunodeficiency: United Kingdom experience. *Blood* 2011;117:4367-4375.
301. **Gluckman E, Rocha V.** Cord blood transplantation for children with acute leukaemia: a Eurocord registry analysis. *Blood Cells Mol Dis* 2004;33:271-273.
302. **Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, Miller JS, Wagner JE.** Rapid and complete donor chimerism in adult recipients of unrelated donor umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning. *Blood* 2003;102:1915-1919.
303. **Chakraverty R, Peggs K, Chopra R, Milligan DW, Kottaridis PD, Verfuert S, Geary J, Thuraisundaram D, Branson**

- K, Chakrabarti S, Mahendra P, Craddock C, Parker A, Hunter A, Hale G, Waldmann H, Williams CD, Yong K, Linch DC, Goldstone AH, Mackinnon S. Limiting transplantation-related mortality following unrelated donor stem cell transplantation by using a nonmyeloablative conditioning regimen. *Blood* 2002;99:1071-1078.
304. Niederwieser D, Maris M, Shizuru JA, Petersdorf E, Hegenbart U, Sandmaier BM, Maloney DG, Storer B, Lange T, Chauncey T, Deininger M, Pönisch W, Anasetti C, Woolfrey A, Little MT, Blume KG, McSweeney PA, Storb RF. Low-dose total body irradiation (TBI) and fludarabine followed by hematopoietic cell transplantation (HCT) from HLA-matched or mismatched unrelated donors and postgrafting immunosuppression with cyclosporine and mycophenolate mofetil (MMF) can induce durable complete chimerism and sustained remissions in patients with hematological diseases. *Blood* 2003; 101:1620-1629.
305. Rizzieri DA, Long GD, Vredenburgh JJ, Gasparetto C, Morris A, Stenzel TT, Davis P, Chao NJ. Successful allogeneic engraftment of mismatched unrelated cord blood following a nonmyeloablative preparative regimen. *Blood* 2001;98:3486-3488.
306. Hong JY, Choi MK, Kim DH, Kim SJ, Kim K, Kim WS, Chung CW, Kim HO, Min YH, Jang JH. Feasibility of second hematopoietic stem cell transplantation using reduced-intensity conditioning with fludarabine and melphalan after a failed autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Proc* 2010;42:3723-3728.
307. Delgado J, Marco A, Moreno E, Pinana J, Valcarcel D, Martino R, Briones J, Sureda A, Brunet S, Sierra J. Reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation using oral fludarabine as part of the conditioning regimen. *Cytotherapy* 2009;11:356-361.
308. Velazquez-Sanchez-de-Cima S, Zamora-Ortiz G, Hernandez-Reyes J, Rosales-Duron AD, Gonzalez-Ramirez MP, Martagon-Herrera NA, Ruiz-Delgado GJ, Ruiz-Argüelles GJ. Oral versus intravenous fludarabine as part of a reduced-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Acta Haematol* 2014;132:125-128.
309. Lee KH, Lee JH, Lee JH, Kim DY, Seol M, Lee YS, Kang YA, Jeon M, Hwang HJ, Jung AR, Kim SH, Yun SC, Shin HJ. Reduced-intensity conditioning therapy with busulfan, fludarabine, and antithymocyte globulin for HLA-haploidentical hematopoietic cell transplantation in acute leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 2011;118:2609-2617.
310. Palma J, Salas L, Carrion F, Sotomayor C, Catalan P, Paris C, Turner V, Jorquera H, Handgretinger R, Rivera GK. Haploidentical stem cell transplantation for children with high-risk leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2012;59:895-901.
311. Federmann B, Bornhauser M, Meisner C, Kordelas L, Beelen DW, Stuhler G, Stelljes M, Schwerdtfeger R, Christopeit M, Behre G, Faul C, Vogel W, Schumm M, Handgretinger R, Kanz L, Bethge WA. Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults using CD3/CD19 depletion and reduced intensity conditioning: a phase II study. *Haematologica* 2012;97:1523-1531.
312. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant* 2005;35:107-119.

313. Baron F, Baker JE, Storb R, Gooley TA, Sandmaier BM, Maris MB, Maloney DG, Heimfeld S, Oparin D, Zellmer E, Radich JP, Grumet FC, Blume KG, Chauncey TR, Little MT. Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood* 2004;104:2254-2262.
314. Khera N, Storer B, Sandmaier BM, Chapko MK, Lee SJ. Costs of second allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transplantation* 2013; 96:108-115.
315. Saito AM, Zahrieh D, Cutler C, Ho VT, Antin JH, Soiffer RJ, Alyea EP, Lee SJ. Lower costs associated with hematopoietic cell transplantation using reduced intensity vs high-dose regimens for hematological malignancy. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:209-217.
316. Matthes-Martin S, Potschger U, Barr R, Martin M, Boztug H, Klingebiel T, Attarbaschi A, Eibler W, Mann G. Costs and cost-effectiveness of allogeneic stem cell transplantation in children are predictable. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;18(10):1533-1539.
317. Khera N, Zeliadt SB, Lee SJ. Economics of hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2012;120:1545-1551.
318. Gonzalez-Llano O, Mancias-Guerra C, Cantu-Rodriguez OG, Hernandez-Garza NE, Quiroga-Rivera A, Herrera-Garza JL, Jaime-Pérez JC, Gómez-Almaguer D. Bone marrow transplantation in a child with hemophagocytic lymphohistocytosis using a less toxic conditioning regimen. *Arch Med Res* 1999;30:338-340.
319. Gomez-Almaguer D, Ruiz-Arguelles GJ, Ruiz-Arguelles A, Gonzalez-Llano O, Cantu OE, Hernandez NE. Hematopoietic stem cell allografts using a nonmyeloablative conditioning regimen can be safely performed on an outpatient basis: report of four cases. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:131-133.
320. Gomez-Almaguer D, Ruiz-Arguelles GJ, Tarin-Arzaga Ldel C, Gonzalez-Llano O, Jaime-Perez JC, Lopez-Martinez B, Cantú-Rodríguez OG, Herrera-Garza JL. Reduced-intensity stem cell transplantation in children and adolescents: the Mexican experience. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9:157-161.
321. Gonzalez-Llano O, Jaime-Perez J, Cantu-Rodriguez O, Mancias-Guerra C, Gutierrez-Aguirre H, Herrera-Garza J, Gomez-Almaguer D. Successful father-to-son stem cell transplantation in a child with hemophagocytic lymphohistocytosis using a reduced-intensity conditioning regimen. *Eur J Haematol* 2006;77:341-344.
322. Cantu-Rodriguez OG, Jaime-Perez JC, Gutierrez-Aguirre CH, Gonzalez-Llano O, Mancias-Guerra C, Tarin-Arzaga LC, Ruiz-Delgado GJ, Sandoval-Villa CC, Marfil-Rivera J, Morales-Toquero A, Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Almaguer D. Outpatient allografting using nonmyeloablative conditioning: the Mexican experience. *Bone marrow transplant* 2007;40:119-123.
323. Gomez-Almaguer D, Ruiz-Arguelles GJ, del Carmen Tarin-Arzaga L, Gonzalez-Llano O, Gutierrez-Aguirre H, Cantu-Rodriguez O, Jaime-Pérez J, Carrasco-Yalán A, Giral S. Alemtuzumab for the treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Biology Blood Marrow Transplant* 2008;14:10-15.
324. Llano OG, Perez JC, Rodriguez OC, Guerra CM, Aguirre HG, Garza JL, Rodriguez-Romo L, Almaguer DG. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using a reduced-intensity conditioning regimen in infants: experience at a single

- institution in Mexico. *Pediatr Hematol Oncol* 2008;25:39-47.
325. **Rodriguez-Romo L, Mancias-Guerra C, Gonzalez-Llano O, Jaime-Perez JC, Martinez-Cabriales S, Garcia-Rodriguez F, Gómez-Almaguer D.** Outpatient reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia in children. *Br J Haematol* 2010;151:200-202.
326. **Ruiz-Delgado GJ, Mancias-Guerra C, Macias-Gallardo J, Gonzalez-Llano O, Hernandez-Arizpe A, Rodriguez-Romo LN, Martinez-Cabriales SA, Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles GJ.** Long-term results of placental blood allografting using reduced-intensity conditioning: multicenter experience in a developing country. *Hematology* 2011;16:155-159.
327. **Gonzalez-Llano O, Rodriguez-Romo LN, Mancias-Guerra Mdel C, Tarin-Arzaga L, Jaime-Perez JC, Herrera-Garza JL, Cantú-Rodríguez OG, Gutiérrez-Aguirre CH, García-Sepúlveda RD, García-Marín AY, Villarreal-Martínez L, Salazar-Riojas Mdel R, Gómez-Almaguer D.** Feasibility of an outpatient HLA haploidentical stem cell transplantation program in children using a reduced-intensity conditioning regimen and CD3-CD19 depletion. *Hematology* 2014;19:10-17.