

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**TRASPLANTE DE PROGENITORES
HEMATOPOYÉTICOS CON
ACONDICIONAMIENTO DE INTENSIDAD
REDUCIDA: APLICABILIDAD EN
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA Y
SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS**

DAVID VALCÁRCEL FERREIRAS

2014

TESIS DOCTORAL

**TRASPLANTE DE PROGENITORES
HEMATOPOYÉTICOS CON
ACONDICIONAMIENTO DE
INTENSIDAD REDUCIDA:
APLICABILIDAD EN LEUCEMIA
MIELOIDE AGUDA Y SÍNDROMES
MIELODISPLÁSICOS**

POR: DAVID VALCARCEL FERREIRAS

DIRECTORES DELA TESIS: RODRIGO MARTINO BOFARULL Y JORDI SIERRA GIL

DEPARTAMENTO MEDICINA
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

AÑO 2014

**No te quedes inmóvil
al borde del camino**

Mario Benedetti (del poema "No te Salves")

Agradecimientos

Han sido muchas las personas que me han ayudado de diferentes maneras en estos años en la elaboración de los diferentes trabajos que componen esta Tesis Doctoral, por lo tanto el listado de agradecimientos sería enorme, a todos les estoy muy agradecido y cada una de estas personas lo sabe.

No quiero enumerar de todas y cada una de estas personas pero si hacer explícito mi agradecimiento a la gente sin cuya ayuda no hubiese podido, de ninguna de las maneras, llevar a cabo lo que hasta ahora está siendo mi carrera profesional, que llega a uno de sus puntos importantes con la elaboración de la presente tesis doctoral.

A mis **padres**, no solo por serlo, que ya es más que suficiente sino por haberme estimulado continuamente a avanzar, a preguntar a trabajar. Desde mis primeros recuerdos en el colegio ayudándome con los deberes.... hasta la semana pasada preguntando por cuando pensaba acabar la tesis han sido fundamentales, imprescindibles.

A **Inés e Iago** que con una sonrisa me ayudan y me dejan que dedique tanto tiempo al estudio y trabajo.

A **Rodrigo Martino**, codirector de esta tesis y coautor de todos los trabajos, por su apoyo, paciencia y estímulo para poder llevar a cabo los cuatro trabajos que conforman esta tesis doctoral y también los que no están aquí.

Tabla de contenido

Glosario Abreviaturas

9

Motivación de la tesis

11

Antecedentes y justificación

13

Ámbito de estudio

15

Introducción

17

Leucemia Mieloide Aguda

17

Definición, epidemiología y clasificación.

17

Pronóstico

18

Tratamiento de la leucemia mieloide aguda

21

Síndromes Mielodisplásicos

27

Definición, epidemiología y clasificación

27

Pronóstico

27

El tratamiento de los SMD

31

El trasplante alogénico como tratamiento curativo en la LMA y el SMD

37

Reseña histórica

37

El efecto injerto contra leucemia

38

Trasplante alogénico en Leucemia Mieloide Aguda

39

Trasplante hematopoyético alogénico en síndromes mielodisplásicos

41

El trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida

44

Modelos animales de acondicionamiento de intensidad reducida

44

Desarrollo clínico

46

Objetivos

49

Justificación de la unidad temática

50

Resultados

51

Objetivo 1: Estudio de la mortalidad asociada al trasplante en pacientes con neoplasias hematológicas que recibieron un Alo-TIR y su comparación con los tratados con Alo-TPH con acondicionamiento convencional.

52

Resumen:

52

Justificación

53

Pacientes y métodos:

53

Resultados

56

Objetivo 2: Estudio de la eficacia del Alo-TIR en LMA y SMD a largo plazo. Efecto de

| | |
|---|------------|
| la enfermedad injerto contra huésped crónica en la supervivencia. | 71 |
| Resumen | 71 |
| Justificación | 71 |
| Pacientes y métodos: | 72 |
| Resultados | 76 |
| Objetivo 3: Análisis de la mortalidad relacionada con el tratamiento en pacientes con LMA y SMD de alto riesgo. Comparación entre el Alo-TIR y el Alo-Conv con selección positiva de células CD 34+ en pacientes que reciben un trasplante de donante familiar HLA idéntico. | 90 |
| Resumen: | 90 |
| Justificación | 90 |
| Pacientes y métodos | 91 |
| Resultados | 93 |
| Apéndice: Estudio de quimerismo hematopoyético en el trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida | 105 |
| Discusión..... | 112 |
| Sobre el apéndice (trabajo 4, anexo 1)) | 112 |
| Sobre el primer trabajo de la Tesis. | 115 |
| Sobre el segundo trabajo de la Tesis. | 121 |
| Sobre el tercer trabajo de la Tesis. | 126 |
| Próximos pasos | 129 |
| Conclusiones | 131 |
| Bibliografía | 132 |

Glosario Abreviaturas

| | |
|---|--|
| AcM: Anticuerpo monoclonal | ILT: Irradiación linfoide total |
| Alo-CONV: Trasplante alogénico con acondicionamiento convencional | Inv: inversión |
| Alo-TPH: Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos | IPSS: Índice Pronóstico Internacional |
| Alo-TIR: Trasplante alogénico de intensidad reducida | LMA: Leucemia mieloide aguda |
| ARA-C: Arabinosido de citosina | MMF: Micofenolato de mofetilo |
| ATG: Globulina anti-timocítica | MTX: Metotrexate |
| CsA: Ciclosporina | MRC: Medical Research Council |
| del: Delección | MO: Médula ósea. |
| EICL: Efecto injerto contra leucemia | MRT: Mortalidad relacionada con el tratamiento |
| EICR: Enfermedad del injerto contra el receptor | OMS: Organización Mundial de la Salud |
| EICT: Efecto injerto contra tumor | QT: Quimioterapia |
| Ej: Ejemplo | RC: Remisión completa |
| FAB: Franco-Americano-Británica | RR: Riesgo relativo |
| FLT-3: FMS-like tyrosine kinase 3 | RT: Radioterapia |
| G-CSF: Factor estimulante de colonias granulocíticas | SMD: Síndrome mielodisplásico |
| IC 95%: Intervalo de confianza del 95% | SG: Supervivencia global |
| ICT: Irradiación corporal total | SLE Supervivencia libre de enfermedad |
| IT: Irradiación tímica | SP: Sangre periférica |
| | SWOG: Southwest Oncology Group |
| | t: Traslocación |

Motivación de la tesis

¿Por qué hacer una Tesis Doctoral en 2012? En esta época en la que la tecnología pone a nuestro alcance toda la información científica a un golpe de “click”, puede resultar extraño mostrar interés en realizar el esfuerzo de escribir una tesis doctoral, que será leída por un número muy reducido de personas. En mi caso puedo destacar tres motivos que me han llevado a dar este paso en mi carrera académica.

El primero fue tomarme un tiempo para revisar lo que he estado haciendo en los últimos años, reflexionar sobre ello y encontrar tanto posibles errores como futuros pasos .

El segundo motivo fue el de cerrar una etapa académica que se inició en 1992 cuando empecé la carrera de Medicina y Cirugía en Valencia, con mucha ilusión aunque sin una idea clara de hacia donde querría dirigir mis pasos en el futuro.

El tercero los motivos, y no por ello menos importante, es de carácter absolutamente personal y afectivo; es mi manera de rendir homenaje a mis padres por el esfuerzo realizado en mi formación, tanto como persona como en el ámbito profesional, ya que me consta que es para ellos un orgullo ver a su hijo convertido en Doctor.

El tema escogido para la Tesis Doctoral es el Trasplante Alogénico con Acondicionamiento de Intensidad Reducida. El azar está muy presente en muchas decisiones importantes en la vida y así fue también en la elección del tema de lo que han supuesto mis primeros pasos en la investigación clínica. El inicio de mi residencia, en 1999 en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, coincidió en el tiempo con los primeros años de desarrollo de los acondicionamientos de intensidad reducida, cuyos primeros resultados clínicos se publicaron a finales de los años 90. Desde mi primera rotación en la sala de hospitalización de Sant Rafael, los entonces llamados “mini-alos” resultaron de mi interés, en cuanto suponían un gran cambio en algunos de los conceptos clásicos sobre los que sustentaba el trasplante alogénico. La cercanía de mis entonces adjuntos y en especial la posibilidad de colaborar con Rodrigo Martino supusieron un estímulo enorme para el estudio y un apoyo constante para el desarrollo de mis primeros trabajos. En los años siguientes, el trabajo diario en el hospital y la lectura de los

trabajos publicados en este campo sirvieron de fundamento para continuar con estudios sobre la aplicabilidad de esta terapia y enfocar el análisis de su utilidad en el ámbito de la leucemia mieloide aguda y los síndromes mielodisplásicos, que son las patologías de interés principal en el Hospital de Sant Pau.

Antecedentes y justificación

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (Alo-TPH) ofrece una opción curativa a algunos pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) y síndrome mielodisplásicos (SMD). El efecto curativo en estos pacientes se obtiene mediante la quimioterapia (QT) y/o radioterapia (RT) de acondicionamiento que se aplica antes del trasplante y mediante el llamado efecto injerto contra tumor (EICT) desarrollado por células inmunes derivadas de los progenitores hematopoyéticos del donante.

La mejora en el conocimiento de la biología del trasplante y el reconocimiento del papel predominante del EICT como mecanismo de curación en los pacientes que reciben un Alo-TPH promovió el desarrollo de nuevos esquemas de acondicionamiento para el trasplante que se basan en una potente inmunosupresión y una baja o nula mielodepresión y toxicidad extra-hematológica, que permite el injerto hematopoyético de las células del donante reduciendo los efectos tóxicos del acondicionamiento. Este tipo de trasplantes se conoce como trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida (Alo-TIR) y fundamenta su capacidad anti-tumoral en el desarrollo del EICT.

La instauración de esta modalidad de trasplante tiene por objetivo extender la capacidad curativa del Alo-TPH, mediante el EICT, a la mayor cantidad de pacientes posible, especialmente a aquéllos que debido a su edad o a la presencia de comorbilidades tienen un elevado riesgo de mortalidad relacionada con el trasplante (MRT). Este tipo de acondicionamiento tiene especial relevancia en las LMA y SMD, patologías que se presentan en pacientes con una edad mediana de alrededor de 70 años, lo que impide en la mayor parte de los pacientes proceder a

El acondicionamiento que se usó consistió en la siguiente combinación de fármacos:

- Fludarabina a dosis de 150 mg/m²
- Un agente alquilante
 - o Busulfán en neoplasias mieloides a dosis de 8-10 mg/kg o
 - o Melfalán en neoplasias linfoides a dosis de 140 mg/m².
- Los fármacos inmunosupresores que se usaron fueron ciclosporina y metotrexate en pauta corta o micofenolato mofetil.

un trasplante con acondicionamiento convencional, basado en dosis altas de QT/RT, por presentar un elevado riesgo de mortalidad y morbilidad por el procedimiento.

La presente tesis doctoral describe los resultados obtenidos en cuanto a eficacia y toxicidad con la aplicación del Alo-TIR en pacientes con enfermedades hematológicas en general y más en concreto en pacientes con LMA y SMD.

Ámbito de estudio

Las LMA y los SMD son conceptualmente dos patologías diferentes: Con todo, es frecuente que en la práctica clínica y en las publicaciones se agrupen las LMA y los SMD con un índice pronóstico internacional (IPSS) de riesgo intermedio-2 y alto riesgo (a los que a partir de ahora me referiré conjuntamente como SMD de alto riesgo). Se considera ambas enfermedades como diferentes espectros de una misma patología, lo que justifica que en los trabajos 2º y 3º que conforman la tesis se incluyeran ambas patologías. Por otro lado, la leucemia promielocítica, que tiene unas características clínicas y terapéuticas muy concretas y que la hacen merecedora de una consideración especial, no es objeto del estudio de esta tesis y no será tratada en ninguno de los apartados.

Recientemente, se ha intentado definir lo que son trasplantes de intensidad reducida en función de la dosis máxima de los fármacos del acondicionamiento. Aunque la dosis de busulfán máxima admitida es de 8 mg/kg vía oral (o 6.4 mg/kg por vía endovenosa), cuando se empezaron a realizar estos trasplantes, la administración de 10 mg/kg como en muchos pacientes de los trabajos que conforman esta tesis se consideraba un trasplante de intensidad reducida. Además, como se podrá observar en los resultados de los diferentes trabajos, la mortalidad asociada al procedimiento fue muy inferior a la esperable con acondicionamiento convencional (con dosis de busulfán oral de 16 mg/kg); en consecuencia, los esquemas usados en los siguientes trabajos deben considerarse como de intensidad reducida.

Introducción

Leucemia Mieloide Aguda

Definición, epidemiología y clasificación.

Bajo el término de leucemia aguda mieloide (LMA) se engloba un conjunto de enfermedades neoplásicas de progenitores mielopoyéticos, que se caracterizan por limitada o nula capacidad de diferenciación a formas más maduras y por una alta capacidad proliferativa. Ello origina el acumulo de células leucémicas (conocidas como blastos) en la médula ósea (MO), la sangre periférica (SP) y en ocasiones en otros tejidos. Se trata de una enfermedad clonal, en la que las células leucémicas descienden de una célula progenitora que es minoritaria en el conjunto de la población neoplásica ($0.2-100/100^6$) y que expresa un fenotipo primitivo, caracterizado por una intensa positividad para el antígeno CD34 y la negatividad del antígeno CD38. El diagnóstico requiere la presencia de más de un 20% de blastos en la médula ósea o sangre periférica (excepto en aquellos casos en los que se demuestra una alteración citogenética propia y característica de la LMA) (*Arber D.A, 2008a; Arber D.A, 2008b*)

La incidencia de la LMA es de alrededor de 2-4 casos por cada 100.000 habitantes/año y la edad mediana de presentación es de 70 años, con una relación mujer/hombre de 2/3 (*Parkin DM, 2005*). La etiología es desconocida, y aunque se han descrito diversos factores de riesgo como las radiaciones ionizantes, la exposición a benceno o a sus derivados, o haber recibido quimioterapia previamente, la mayor parte de los pacientes no presentan ninguno de estos factores de riesgo.

A pesar de que la clasificación Franco-Americano-Británica (FAB) se ha usado ampliamente desde hace 30 años, en los últimos 10 el uso de la clasificación OMS se ha impuesto, ya que además de los aspectos morfológicos incluye datos citogenéticos y de biología molecular, lo que permite una mejor identificación de entidades específicas. En la tabla 1 se resumen las entidades recogidas en la clasificación de la OMS.

Tabla 1: Clasificación de las leucemias agudas según la OMS.

| CATEGORIA | ENTIDADES INCLUIDAS |
|---|---|
| LMA con alteraciones genéticas recurrentes | <p>LMA CON TRASLOCACIONES BALANCEADAS/INVERSIONES</p> <ul style="list-style-type: none"> - LMA con t(8,21)(q22,q22); RUNX1-RUNX1T1 - LMA con inv(16)(p13.1,q22) o t(16,16) (p13.1,q22); CBFB-MYH11 - LMA con t(15,17)(q22,q12); PML-RARA - LMA con t(9,11)(p22,q23); MLLT3-MLL - LMA con t(6,9)(p23,q34); DEK-NUP214 - LMA con inv(3)(q21,q26.2) o t(3,3)(q21,q26.2); RPN1-EVI-1 - LMA con t(1,22)(p13,q13); RBM15-MKL1 <p>LMA CON MUTACIONES GENÉTICAS</p> <p>Genes mutados en leucemias con cariotipo anormal:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mutación de KIT. Con t(8,21)(q22,q22) o inv(16)(p13.1,q22) o t(16,16) (p13.1,q22) <p>Genes mutados en leucemias con cariotipo normal</p> <ul style="list-style-type: none"> - FLT3-ITD; FLT3/TKD; MLL-PTD; CEBPA; NPM1; WT1; BAALC; ERG; MN1 |
| LMA con cambios asociados a SMD | <ul style="list-style-type: none"> - LMA con características morfológicas de SMD - LMA con historia previa de un SMD o un SMP - LMA con alteraciones citogenéticas asociadas a un SMD |
| LMA asociada a tratamientos previos | <ul style="list-style-type: none"> - LMA asociada con agentes alquilantes - LMA asociada con radiaciones ionizantes - LMA asociada con inhibidores de topoisomerasa II - LMA asociada con otros agentes (antimetabolito, antitubulina) |
| LMA no especificada | <ul style="list-style-type: none"> - LMA mínimamente diferenciada - LMA sin maduración - LMA con maduración - LMA mielomonocítica - LMA monoblástica y monocítica - LMA eritroide - LMA megacarioblástica - LMA basofílica - Panmielosis aguda con mielofibrosis. |
| Sarcoma mieloide | |
| Proliferaciones mieloides asociadas a S. Down | <ul style="list-style-type: none"> - Mielopoyesis anormal transitoria - Leucemia aguda asociada a S. Down. |

Modificado de: Ardbber D.A, 2008 a,b,c; Vardiman JW, 2008; Pileri S.A 2008.

Pronóstico

En la estratificación clásica del pronóstico de las LMA intervienen diversas variables que se pueden clasificar según sean inherentes a la LMA como el cariotipo (*Grimwade D, et al 1998, 2010; Slovack ML et al 2000*), el número de ciclos para alcanzar la remisión completa o la cifra de leucocitos al diagnóstico y otros relativos al paciente como la edad (*Appelbaum FR, et al 2006*) y estado general (*Estey E, 2001*) (tabla 2)

El estudio del cariotipo

Probablemente el marcador pronóstico más importante sea la presencia de alteraciones citogenéticas en el momento del diagnóstico; de ellas se han descrito más de 200 variantes estructurales o numéricas (Mrózek K, 2004). Aunque hay numerosas clasificaciones, las dos más usadas, que muestran impacto pronóstico, son la de los grupos *Medical Research Council* (MRC) (Grimwade D, 1998) y *Southwest Oncology Group* (SWOG) (Slovak M, 2000). Ambas clasificaciones separan los pacientes, según el cariotipo en el momento del diagnóstico, en tres grupos con diferente pronóstico (favorable, intermedio y desfavorable) (tabla 3). El patrón citogenético más habitual, en alrededor de un 45% de los pacientes, es el cariotipo normal que se considera de riesgo intermedio en ambas clasificaciones; sin embargo el comportamiento de este grupo de pacientes es muy heterogéneo, por lo que se realizan numerosos esfuerzos para subclasificar este gran grupo.

Las alteraciones moleculares

El desarrollo de las técnicas de biología molecular ha supuesto un gran avance en el campo de las LMA, igual que en otras áreas de la medicina.

Por un lado ha permitido relacionar algunas alteraciones citogenéticas bien conocidas con su correspondiente alteración molecular. Por otra parte, el conocimiento de estas mutaciones ha favorecido la comprensión de la patogenia de las LMA, al identificarse el mecanismo por el que las alteraciones genéticas se asocian a leucemogénesis; en ese sentido las alteraciones moleculares pueden dividirse en tres grandes grupos: a) Mutaciones clase I, que interfieren con el proceso de proliferación (Ej: Mutaciones de FLT3); b) mutaciones clase II que interfieren la diferenciación (Ej: mutaciones de CBF o de MLL) y c) mutaciones clase III que alteran el ciclo celular o la apoptosis (Ej: NPM1) (Haferlach T, 2008). Se ha planteado la hipótesis que son necesarias al menos dos mutaciones para el desarrollo de una LMA, en lo que se conoce como patogénesis “*multistep*” de la LMA (Baldus B.C, 2007)

Desde el punto de vista de su aplicación clínica, la determinación de diferentes alteraciones moleculares en los pacientes con LMA, permite clasificar los pacientes con cariotipo normal en al menos dos grupos de diferente pronóstico, lo que permite individualizar el tratamiento de estos pacientes. Entre estas alteraciones moleculares destacan como marcadores de mal pronóstico la presencia de

mutación en tándem del gen FLT-3, la mutación parcial en tándem del gen MLL, la mutación de los genes WT1 o KIT, la sobre-expresión de los genes BAALC, ERG y MN. Por el contrario, las mutaciones de los genes NPM1, CEBPA se asocian a buen pronóstico. (*Baldus S.D, 2007*) Mas recientemente se han añadido nuevas anomalías como las que afectan al el gen DNMT3A (*Ley T.J, 2010*), que se encuentra mutado en alrededor del 25% de los pacientes y se asocia a mal pronóstico, o al gen IDH que se encuentra mutado en menos casos (alrededor del 7% de los pacientes con cariotipo normal) y también asociado a pronóstico desfavorable (*Schnittger S, 2010; Li Z, 2013*)

Por otro lado, recientes estudios han mostrado la posibilidad de establecer grupos pronósticos en función del perfil de expresión genética y cómo estos perfiles genéticos se asocian a anomalías específicas morfológicas, citogenéticas y moleculares (*Bullinger L, 2004; Valk PJM, 2004; Radmacher MD, 2006*)

En la actualidad, algunas de estas alteraciones moleculares, que codifican proteínas probablemente relacionadas con la leucemogénesis, ya son objeto de estudio para desarrollar fármacos que las tengan como diana.

Tabla 2: Variables asociadas a mal pronóstico en la LMA

| CLINICOS Y DE LABORATORIO |
|---|
| Edad avanzada, mal estado general según ECOG, exposición previa a quimioterapia o radioterapia Leucocitosis superior 50-100 x10 ⁹ hepática. |
| CITOGENÉTICOS |
| Cariotipo complejo (más de dos alteraciones, excluidas las LMA con alteraciones citogenéticas de riesgo bajo). Alteraciones de 3q, 21q26, 11q23*, 12p, 17p, 9q*, 20q, 21q, del (5q), del (7q)*, t(6,9) (p23;q34); t (9,22) (q34;q11.2), monosomía 5 ó 7 |
| MOLECULARES |
| Duplicación en tándem de FLT-3, mutación del gen MLL, sobre-expresión de BAALC, WT1, ERG, MN1 |

* Considerada como de riesgo intermedio según el MRC y alto riesgo según el SWOG. t: traslocación; del: delección.

Tratamiento de la leucemia mieloide aguda

El tratamiento de las LMA tiene dos fases bien diferenciadas, cada una con sus objetivos. La primera fase es el tratamiento de inducción, cuya finalidad es la obtención de la remisión completa (RC); una vez lograda la RC el segundo paso es el tratamiento de consolidación/intensificación, con el objetivo de evitar la recidiva de la LMA que se produce de forma prácticamente universal si no se hace más tratamiento post-inducción (*Cassileth P.A, 1988*)

El tratamiento de inducción

Esta etapa tiene como finalidad reducir la cantidad de células leucémicas lo máximo posible, hasta al menos un nivel indetectable por microscopía óptica, lo que se denomina RC morfológica: Este objetivo se alcanza en alrededor del 70% de los pacientes. Para la terapia de inducción, en general no se hacen distinciones según los factores de riesgo y el tratamiento es el mismo para todos los pacientes. El tratamiento de inducción más usado y considerado como estándar es el conocido como “3+7” que consiste en la administración de una antraciclina los tres primeros días (daunorubicina, idarubicina, doxorubicina o mitoxantrone) con arabinosido de citarabina (ARA-C) en infusión continua y en dosis de 100-200 mg/m² durante 7 días (*Ravandi F, 2007*). La investigación en los últimos 20 años acerca del tratamiento de inducción se ha centrado fundamentalmente en tres aspectos.

- 1) *Seleccionar el tipo de antraciclina más adecuado*: La antraciclina más frecuentemente utilizada es la daunorubicina en dosis de 45-60 mg/m², aunque el uso en su lugar de idarubicina en dosis de 12 mg/m² parece asociarse a mayor tasa de obtención de RC y menor necesidad de usar dos ciclos para alcanzarla (*AML collaborative Group ,1998*). Por este motivo, en un gran número de centros idarubicina es la antraciclina de elección. Otra opción es el uso de mitoxantrone, una antracenodiona, que se ha usado en lugar de las antraciclinas antes mencionadas, sin que su uso haya demostrado beneficios significativos (*Arlin Z.A, 1991*). Recientemente se ha comprobado que el uso de dosis más elevadas de antraciclinas (daunorubicina 90 mg/m² vs 45 mg/m²) se asocia a un efecto más rápido y

mayor probabilidad de alcanzar remisión completa, aunque el beneficio en términos de supervivencia parece limitarse a los pacientes menores de 65 años (*Lowenberg B, 2009; Fernandez H, 2009*) Además, en una comparación de daunorubicina 50 mg/m² durante 5 días (en lugar de los 3 días habituales) vs Idarubicina 12 mg/m² (dosis estándar, 3 días) se observó se observó con ambas antraciclinas una tasa similar de remisiones completas, así como de SLE y SG a largo plazo (*Shigeki O, Blood 2010*).

- 2) *La dosis de ARA-C más apropiada:* El uso de dosis altas de ARA-C (1000-3000 mg/m² en infusión de 2-3 horas y cada 12 horas por un total de 8 a 12 ciclos) se ha estudiado frente a dosis convencionales (100-200 mg/m² en infusión continua, durante 7 días consecutivos), en varios estudios aleatorizados (*Phillips GL, 1991; Schiller G, 1992; Bishop J.F, 1996; Weick J.K, 1996*). Los resultados muestran que las dosis altas de ARA-C no ofrecen grandes ventajas, ya que se obtienen tasas similares de RC y de SG, con mayor toxicidad asociada al tratamiento.
- 3) *La adición de un tercer fármaco para mejorar los resultados:* Con la intención de mejorar los resultados se ha investigado la adición de diversos fármacos al esquema básico constituido por ARA-C y una antraciclina.

El etopósido (en dosis de 75-100 mg/m² durante 3 a 7 días) no aumenta la tasa de RC, aunque en un estudio prolongó la duración de la respuesta y aumentó la supervivencia en pacientes de menos de 50 años (*Bishop JF, 1991 a,b*).

El factor estimulante de crecimiento granulocitario (G-CSF) se ha administrado durante la inducción para sensibilizar las células leucémicas, al hacer que las células entren en división y también reduzcan su adherencia al nicho medular. En un estudio aleatorizado se observó que la adición de G-CSF a la QT, en pacientes con LMA de riesgo estándar, se asoció a mejor SG y SLE (*Lowenberg B, 2003*).

En la actualidad los estudios de nuevos fármacos se centran en aquéllos dirigidos a posibles dianas terapéuticas, como el gentuzumab ozogamicin (*Kell W.J, 2003*) contra el antígeno CD33, frecuentemente expresado de forma intensa por las células leucémicas. Recientemente se han publicado los datos de un ensayo clínico que evaluó la inclusión del gentuzumab en el tratamiento de inducción y consolidación en pacientes

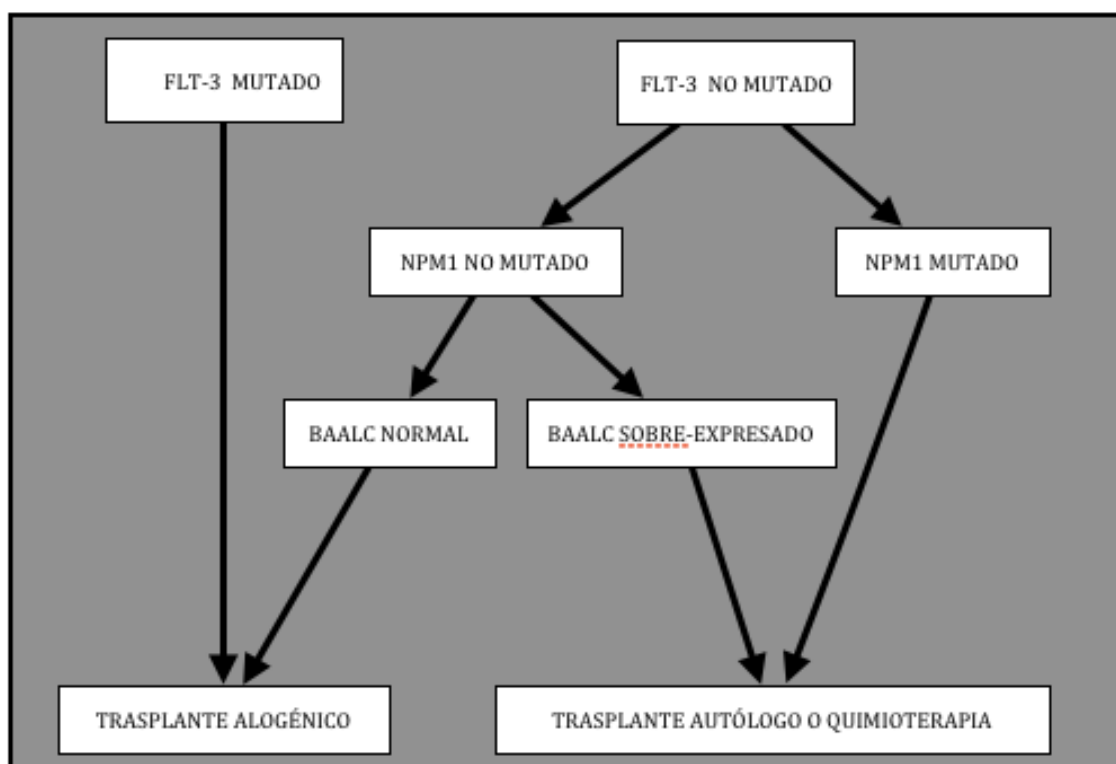
con LMA, sin que su uso se mostrara útil para mejorar los resultados globales; aunque sí que pareció beneficiar al subgrupo de pacientes con mejor pronóstico citogenético (*Burnett AK, 2011*) Por otra parte actualmente se están proponiendo nuevas posologías con este fármaco que están mostrándose eficaces para mejorar los resultados del tratamiento de inducción clásico (*Castaigne S, 2012*)

En un futuro próximo será posible evaluar el impacto de fármacos dirigidos contra las alteraciones moleculares que se utilizan ya ampliamente en ensayos clínicos, como los inhibidores de FLT-3 o los inhibidores de farnesil transferasa como el Tipifarnib, entre muchos otros.

El tratamiento de consolidación (post-inducción)

Esta segunda fase de tratamiento, para la que se requiere haber alcanzado una RC, comprende en general un segundo ciclo de quimioterapia que se considera de consolidación de la RC. Este ciclo habitualmente incluye antraciclinas (la misma o una diferente a la usada en el tratamiento de inducción) y ARA-C en dosis variable, con o sin la adición de un tercer fármaco.

Figura 1: Algoritmo terapéutico en función de las alteraciones moleculares en pacientes con LMA con cariotipo normal.



El tratamiento se suele ajustar según los factores de riesgo intrínsecos de la LMA (descritos en la sección previa). En la tabla 3 aparecen los factores de riesgo que permiten clasificar los pacientes en 3 grupos de riesgo y el tratamiento que suele ofrecerse en cada una de las situaciones.

El grupo de **pacientes de bajo riesgo** suele recibir dosis altas de ARA-C (3g/m² dos veces al día los días 1, 3 y 5 de ciclo), ya que ofrece resultados mejores que las dosis convencionales (Mayer RJ, 1994; Weick JK, 1996; Byrd JC, 1999 y 2004). Con este tratamiento se logra una SG a largo plazo de alrededor del 65% (Cassileth PA, 1992; Bloomfield CD, 1998) Estos resultados no mejoran con combinaciones de fármacos (Rees JK, 1996; Kern W, 2006; Moore JO, 2005) o con estrategias de trasplante autólogo o alogénico (Cornelissen JJ, 2007; Yanada M, 2005), por lo que el trasplante se reserva para segunda línea en caso de recidiva. Aunque la presencia de determinadas alteraciones genéticas como las mutaciones de c-KIT se asocian a peor pronóstico en este grupo de pacientes, el beneficio de terapias como el trasplante en este subgrupo no se determinado todavía, y es motivo de estudio en la actualidad (Cairolì R, 2006).

Tabla 3: Clasificación de la LMA en función del riesgo de recidiva, según las alteraciones citogenéticas y moleculares y según el tratamiento post-consolidación asociado al riesgo.

| SEGÚN CARIOTIPO | | | |
|---|--|---|---|
| RIESGO BAJO | RIESGO ESTANDAR | | RIESGO ALTO |
| t (8,21) (q22;q22), t(16,16), (p13;q22) Inv (16) (p13;q22) | t (9;11) (p22;q23), +8, +6, +21, +22., -Y, Del (12p),cariotipo normal | | Cariotipo complejo (más de dos alteraciones no de riesgo bajo Alteraciones de 3q, 21q26, 11q23*, 12p, 17p, 9q*, 20q, 21q, del (5q), del (7q)*, t(6,9) (p23;q34); t (9,22) (q34;q11.2), monosomía 5 o 7 |
| | SEGÚN BIOLOGÍA MOLECULAR (cariotipo normal) | | |
| | RIESGO STANDARD | ALTO RIESGO | |
| | FLT3 (-)/NPM1 (+), CEBPA (+) | FLT3(+); NPM1 (-); MLL (+); WT1 (+);BAALC (+); ERG (+); MN1(+) | |
| TRATAMIENTO POST-INDUCCIÓN PROPUESTO | | | |
| Quimioterapia con atlas dosis de ARA-C TASP | | Alo-TPH | |

Modificada de Slovack ML, 2000. # Según el SWOG, para el MRC más de 4 alteraciones * Considerada como de riesgo intermedio según el MRC y alto riesgo según el SWOG. Las alteraciones no descritas se consideran de riesgo intermedio para el MRC y dentro de un grupo de riesgo desconocido para el SWOG. § Aplicable a los pacientes con cariotipo normal t: traslocación; Inv: inversión; del: delección; + trisomía. (+): mutado; (-) No mutado. TASP: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos; Alo-TPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

Los **pacientes de riesgo intermedio** (aquéllos con citogenética normal o con alteraciones no definidas como de buen o mal pronóstico) ofrecen especial dificultad a la hora de establecer el tratamiento post-remisión. La QT en dosis alta y el trasplante autólogo son opciones que tienen baja mortalidad relacionada con el tratamiento (MRT) (<5%) pero el riesgo de recidiva es de hasta el 50%. El trasplante alogénico tiene mayor poder antileucémico pero se asocia a una MRT de alrededor del 20-30%. El uso de dosis altas de ARA-C logra una SLE de alrededor del 30% en este grupo de pacientes (*Weick JC, 1996*) El TASP permite administrar dosis más altas de QT y de radioterapia (RT) lo que se traduce en una SLE en torno al 45% (*Farag SS, 2005*), mientras que el Alo-TPH, a pesar de la mayor MRT se asocia a una SLE de alrededor del 50-60% (*Cornelissen JJ, 2007*). A pesar de no haber datos definitivos, en dos meta-análisis en que se incluyeron pacientes con LMA de riesgo intermedio, aquellos que se habían asignado genéticamente a recibir un Alo-TPH presentaron mejor SLE, y la diferencia era especialmente remarcable en los pacientes más jóvenes (*Yanada M, 2005; Cornelissen JJ, 2007 Koreth J, 2009*).

La mayor parte de los pacientes en este grupo de riesgo intermedio presenta un cariotipo normal; en este grupo, el estudio de posibles alteraciones moleculares ayuda a definir mejor el pronóstico y por tanto facilita la decisión sobre si ofrecer o no un Alo-TPH en primera RC (*Marcucci G, 2007; Schlenk, RF 2008*). El paradigma de cómo las alteraciones moleculares ayuda a tomar decisiones terapéuticas lo constituye el la asociación de mutaciones FLT3/NPM1, de forma que los pacientes con duplicación interna en tándem de FLT3 se benefician de un trasplante alogénico en comparación con otro tratamiento, mientras que los pacientes con FLT3 no mutado y que presenten mutación de NPM1+ obtienen la misma supervivencia con trasplante alogénico o con otro tratamientos de consolidación (*Schlenk RF, 2008*). La figura 1 muestra un ejemplo de cómo las alteraciones moleculares pueden contribuir en la toma decisiones.

En los **pacientes de riesgo alto**, en general hay una gran coincidencia en que está indicado un Alo-TPH, ya que cualquier otra terapia se asocia a un riesgo muy elevado de recidiva (*Weick JK, 1996; Bloomfield CD, 1998; Grimwade D, 1998; Slovack ML, 2000; Yanada M, 2005; Cornelissen JJ, 2007*) El beneficio del Alo-TPH se explicará en la sección 4.2.

Síndromes Mielodisplásicos

Definición, epidemiología y clasificación

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son un grupo heterogéneo de enfermedades clonales cuyo origen, igual que en las LMA, está en las células progenitoras mieloides de la médula ósea. Los SMD se caracterizan por una hematopoyesis ineficaz, displasia en al menos una de las series celulares de estirpe mieloides y un riesgo variable de transformación en LMA (*Brunning R.D, 2008*). La diferencia principal respecto a las LMA es el porcentaje de blastos presente en MO o SP, que en los SMD es siempre inferior al 20% mientras que en las LMA es superior a esta cifra.

La incidencia de los SMD es de alrededor de 4 casos cada 100.000 habitantes y año y varía según el grupo de edad; así entre la población de más de 70 años los SMD son una de las neoplasias más frecuentes, con una incidencia que supera los 30 casos cada 100.000 habitantes y año mientras que entre la población de menos de 50 años, su incidencia se sitúa por debajo de 1 caso cada 100.000 habitantes y año (*Williamson PJ, 1994*).

En la actualidad los SMD se clasifican según la clasificación de la OMS, que desde 2002 ha desplazado a la clasificación FAB. La clasificación actual de la OMS se actualizó en 2008 (*Brunning R.D, 2008*) y se basa en la presencia de displasia en una o más series, en la cifra de blastos y en las alteraciones citogenéticas (tabla 3).

Pronóstico

Uno de los aspectos más importantes en los SMD es la correcta evaluación de los factores con impacto en el pronóstico, ya que entre las distintas entidades incluidas bajo el término de SMD se encuentran tanto procesos que evolucionan de forma muy indolente, con supervivencia que se prevé superior a los 10 años como procesos agresivos con una esperanza de vida de alrededor de 6 meses. En los últimos 30 años, el intenso trabajo de investigación ha permitido la identificación de múltiples factores que influyen en el pronóstico de los SMD, los más importantes se resumen en la tabla 4.

Tabla 4: Clasificación de los síndromes mielodisplásicos según la OMS

| TIPO DE SMD | HALLAZGOS EN SP | HALLAZGOS EN M.O |
|--|--|---|
| Citopenia refractaria con displasia de una línea. Anemia, Leucopenia o trombopenia). | Una sola citopenia <1% de blastos | Displasia de una línea <5% de blastos. <15% de sideroblastos en anillo. |
| Anemia refractaria con sideroblastos en anillo | Anemia Ausencia de blastos | Displasia eritroide aislada ≥ 15% sideroblastos en anillo < 5% blastos |
| Citopenia refractaria con displasia multilínea | Citopenias <1% de blastos No bastones de Auer < 1x10 | Displasia en dos o más líneas blastos. +/- 15% de sideroblastos en anillo. No bastones de Auer |
| Anemia refractaria con exceso de blastos-1 | Citopenias <2-4% de blastos. No bastones de Auer < 1x10 | Displasia de una o más líneas. 5-9% de blastos No bastones de Auer |
| Anemia refractaria con exceso de blastos-2 | Citopenias <5-19% de blastos. +/- bastones de Auer < 1x10 | Displasia de una o más líneas. 10-19% de blastos +/- bastones de Auer |
| SMD inclasificable | Citopenias ≤ 1% blastos | Displasia de una línea en menos del 10% de las células, con una alteración citogenética sugestiva de SMD <5% blastos |
| SMD con del (5q) aislada | Anemia Plaquetas normales o aumentadas Blastos <1% | Megacariocitos normales o incrementados con núcleo hipolobulado Anomalía citogenética: Del (5q) aislada No bastones de Auer |

Modificado de Brunning 2008. ^a Ocasionalmente dos, pero en caso de pancitopenia se debe clasificar como SMD inclasificable. ^b Si hay entre 2-4% se clasifica como AREB-1 y si hay 1% como SMD no clasificable. ^c >10% de las células en una serie.

En la práctica clínica, para establecer el pronóstico en general se usa el índice pronóstico internacional (IPSS) (*Greenberg P, 1997; Greenberg P, 1998*) en el que se tienen en cuenta los siguientes tres factores: a) Porcentaje de blastos en la M.O, b) número de citopenias, c) cariotipo (Buen pronóstico: Cariotipo normal, Del (5q) aislada, Del (20q) aislada y -Y; Mal pronóstico: Cariotipo complejo o anomalías del cromosoma 7; Pronóstico intermedio: El resto de anomalías no descritas). Con estas tres variables se establecen 4 grupos de riesgo: riesgo bajo, riesgo intermedio-1, riesgo intermedio-2 o alto riesgo¹. La adición a este índice de otras características, como los niveles de LDH permite subclasificar cada uno de los subgrupos, proporcionando mayor predictibilidad (*Germin U, 2005*). Otros factores pronósticos añaden información al IPSS, entre estos destacan por su relevancia

¹ En la práctica clínica, en la literatura científica y de aquí en adelante en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, los pacientes de riesgo intermedio-2 y alto riesgo se considerarán como de riesgo alto, ya que el tratamiento que se les suele ofrecer (especialmente la necesidad de Alo-TPH como terapia curativa) es muy similar.

clínica y utilidad para tomar decisiones en lo referente al tratamiento, la dependencia transfusional y la sobrecarga férrica, ambos asociados a un mayor riesgo de mortalidad y el primero también a mayor riesgo de transformación leucémica. (*Malcovati L, 2005; Balducci L, 2006*)

Tabla 5: Variables asociadas a mal pronóstico en los síndromes mielodisplásicos en el momento del diagnóstico.

| CLINICOS, BIOQUÍMICOS Y HEMATIMÉTRICOS |
|--|
| Edad avanzada, sexo femenino, presencia de comorbilidades, exposición previa a quimioterapia o radioterapia. |
| Número e intensidad de las citopenias, niveles elevados de LDH, niveles elevados de microglobulina, niveles elevados de eritropoyetina. |
| Incremento en la cifra de blastos en sangre periférica o médula ósea. Localización atípica de precursores inmaduros. Presencia de bastones de Auer. Displasia multilínea. Presencia de fibrosis medular extensa. |
| CITOGÉNÉTICOS |
| Cariotipo complejo o anomalías del cromosoma 7. |
| MOLECULARES |
| Mutaciones de p53, ras, fms, c-mpl. Duplicación de FLT-3. Expresión de WT1. |

La ausencia de datos citogenéticos impide la aplicación del IPSS, y en estos casos se puede aplicar el Índice Pronóstico Español, anterior al IPSS y establecido cuando la importancia de los datos citogenéticos no era tan conocida. Este índice incluye el porcentaje de blastos en M.O, la edad y el recuento de plaquetas y establece una clasificación en tres grupos de riesgo (*Sanz G, 1989*)

La clasificación de la OMS, además de distinguir las diferentes entidades que conforman los SMD, tiene también valor pronóstico (*Germing U, 2006; Malcovati L, 2006*)

Más recientemente se desarrolló el WPSS, que incluye la clasificación de la OMS, el estudio citogenético y la necesidad de transfusiones. Con estas tres variables se establecen 5 grupos de riesgo tanto para transformación leucémica como para SG (*Malcovati L, 2007*). Este índice pronóstico, además de incluir directamente la clasificación de la OMS tiene la capacidad de ser aplicado en cualquier momento de la evolución del paciente, a diferencia del IPSS cuya aplicabilidad solo ha sido

estudiada en el momento del diagnóstico. Posteriormente, este índice pronóstico ha sido modificado, y la variable transfusional ha sido substituida por un nivel fijo de hemoglobina, con lo que se da mayor objetividad al índice manteniendo su capacidad de discriminación entre los diferentes grupos de riesgo (*Malcovati, L, 2011*).

El último de los grandes índices pronósticos publicado es el conocido como IPSS revisado, que analiza más de 7.000 pacientes con SMD primario, que no han recibido ningún tratamiento. Este índice se prevé que substituya al previo IPSS. Aunque mantiene la misma estructura e incluye las mismas variables que el índice publicado hace 15 años, presenta unas importantes diferencias. La primera diferencia es que incluye 5 grupos diferentes de anomalías citogenéticas, siguiendo la clasificación propuesta por Schanz et al (*Schanz et al, 2011*) y además les confiere un mayor peso pronóstico en relación a las otras variables. El segundo gran cambio es la modificación de los puntos de corte de cifra de blastos, estableciendo el punto mínimo en el 2% y el máximo en el 10%, lo que refuerza la importancia de las cifras bajas de células blásticas a la vez que reconoce la variabilidad intrínseca de los contajes en cifras intermedias. El tercer cambio introducido es la introducción de diferentes puntos de corte para la intensidad de las citopenias y su consideración de forma individual, lo que asume que no solo importa la presencia o ausencia de una determinada citopenia sino también la intensidad de las mismas. Finalmente en el mismo trabajo se ofrecen unas herramientas para detallar más el pronóstico, incluyendo variables como la edad, los niveles de LDH o de beta 2-microglobulina (*Greenberg P. L, 2012*).

El tratamiento de los SMD

La diferente evolución clínica que pueden seguir los distintos SMD complica enormemente la realización de unas guías terapéuticas uniformes para todos los pacientes. En la práctica clínica, el tratamiento se puede dividir según 2 factores: 1) El tipo de SMD según el IPSS, diferenciando los SMD de riesgo bajo e intermedio-1 (considerados globalmente como de bajo riesgo) y los SMD de riesgo intermedio-2 y alto riesgo (considerados globalmente como de alto riesgo). 2) La edad y comorbilidades del paciente, que permitirá diferenciar los pacientes candidatos a terapias intensivas de aquéllos que no lo son.

Por otra parte el tipo de tratamiento que se ofrece se puede clasificar en tres grandes grupos, que no son excluyentes sino complementarios entre sí: 1) El tratamiento de soporte, que se basa fundamentalmente en la realización de transfusiones y terapia antimicrobiana según sea necesario. 2) El tratamiento farmacológico no intensivo, que en los últimos años ha visto la aparición de nuevos fármacos que han mejorado las opciones terapéuticas de los pacientes y 3) el tratamiento intensivo, que básicamente es sinónimo de trasplante alogénico, la única modalidad con intención curativa. En ocasiones es necesaria la administración de quimioterapia de inducción como en el caso de las LMA con la intención de reducir la cifra de blastos antes del trasplante. La diferenciación entre las dos primeras alternativas es muy tenue y en ocasiones no se puede establecer de forma clara. Se podría considerar que el tratamiento de soporte se basa en intentar mejorar la sintomatología mientras que el tratamiento no intensivo, sin ofrecer una opción curativa, tiene como finalidad la modificación de la historia natural de la enfermedad y persigue no sólo una mejoría sintomática sino un incremento en la SG y evitar o retrasar la evolución a LMA.

El tratamiento de soporte.

Las transfusiones de hematíes y plaquetas, así como el tratamiento de las infecciones mediante antimicrobianos y, en ocasiones, factores estimulantes de colonias granulocitarios (G-CSF) son pilares fundamentales en todos los pacientes

con SMD, ya sea como medidas paliativas o como tratamiento de soporte mientras otra terapia surte efecto.

El tratamiento no intensivo.

Se considera tratamiento farmacológico el uso de distintos fármacos con la intención de mejorar las citopenias y modificar el curso evolutivo de los SMD. El término de tratamiento no intensivo se usa en contraposición al tratamiento con TPH, si bien no tienen porqué ser opciones excluyentes, ya que en muchas ocasiones a un tratamiento farmacológico le sigue un TPH.

El uso de **eritropoyetina** (EPO) (con o sin la asociación de G-CSF) está a caballo entre el tratamiento de soporte y lo que se considera tratamiento no intensivo. Su uso se basa en que en los pacientes con SMD, los niveles de EPO pueden no estar suficientemente elevados en relación con el grado de anemia (*Jacobs A, 1989*) y por lo tanto estos pacientes se podrían beneficiar del tratamiento con EPO exógena. En general las dosis requeridas son altas y el tiempo hasta la respuesta puede ser prolongado (hasta 16 semanas). Los pacientes con mayor probabilidad de respuesta son aquéllos que presentan unos niveles de EPO en sangre inferiores a 500 mU/mL y que tienen un requerimiento transfusional inferior a dos concentrados de hematíes al mes (*Hellstrom-Lindberg E, 2003*). La adición de G-CSF en dosis baja (1 ug/kg/semana 2 ó 3 veces a la semana) a la EPO puede mejorar los resultados en algunos pacientes (*Negrin RS, 1996; Gotlib J, 2009*).

Aunque el objetivo fundamental del tratamiento con EPO es la mejora de la calidad de vida mediante la obtención de independencia transfusional, recientemente se han publicado datos sugiriendo que el uso de agentes eritropoyéticos (AEE) puede asociarse a mejor SG (*Jadersten M, 2008; Park DM, 2008*) En dos estudios comparativos retrospectivos, se comparó una población de pacientes que recibieron tratamiento con AEE +/- G-CSF con una población de pacientes que recibió únicamente tratamiento con transfusiones de hematíes. En los dos trabajos se obtuvieron los mismos resultados; los pacientes que recibieron tratamiento con AEE alcanzaron en mayor medida independencia transfusional, sin un incremento en la evolución a LMA, y además los pacientes bajo tratamiento farmacológico con AEE presentaron mejor SG. Esta mejor supervivencia parece relacionarse con una menor mortalidad no leucémica, lo que se puede explicar por dos motivos: 1) La

menor frecuencia transfusional se asociaría a menor sobrecarga férrica que se ha relacionado con mayor morbi-mortalidad en los pacientes con SMD y 2) Los mejores valores de hemoglobina evitarían las complicaciones relacionadas con la anemia crónica (Itzykson R, 2009) Sin embargo en un trabajo similar prospectivo aleatorizado, el uso de EPO +/- G-CSF vs. tratamiento de soporte se asoció a mejor respuesta y mejor calidad de vida, pero sin beneficio en términos de SG ni transformación leucémica, posiblemente debido al bajo número de pacientes incluidos (Greenberg P, 2009). Hoy en día en la mayoría de las guías de tratamiento de los SMD, se considera que ésta debe ser la primera alternativa en pacientes de bajo riesgo con anemia.

En los últimos años hemos asistido a la aparición de numerosos estudios con fármacos que intentan modificar el curso natural de los pacientes con SMD. En la tabla 5 se resumen las modalidades de tratamiento que se están investigando en la actualidad.

Entre los **fármacos demetilantes** destaca la azacitidina, que ha sido el primer fármaco aprobado en SMD con capacidad de modificar la historia natural de la enfermedad. Los fármacos demetilantes basan su efecto en la presencia de un estado de hipermetilación en algunos genes, que impide la correcta expresión de genes supresores de tumores. La azacitidina es un análogo de la pirimidina que inhibe la ADN metiltransferasa y que además tiene cierto efecto citotóxico directo. Las dosis usadas no tienen repercusión en la metilación normal de otros genes. En pacientes con SMD de alto riesgo no candidatos a trasplante, la azacitidina se considera la primera línea terapéutica ya que en dos ensayos clínicos aleatorizados se mostró superior al grupo de control con placebo o tratamiento estándar (incluyendo tratamiento de soporte, quimioterapia con ARA-C en dosis baja o quimioterapia tipo LMA) (Silverman LR, 2002; Fenaux P, 2009) El tratamiento con azacitidina logró una tasa de respuesta global entre un 40 y 60% (17% en el grupo control), de las cuales entre el 10 y 17% (0% en el grupo control) fueron respuestas completas, 0-25% respuestas parciales (0% en el grupo control) y 21-36% mejoras hematológicas (16% en el grupo control) (Silverman LR, 2006; Fenaux P, 2009). La respuesta favorable se asoció a mejor calidad de vida (Kornblith, 2002) y a mejor

supervivencia libre de enfermedad (SLE) (21 vs 12 meses: $P=0.001$) (*Silverman LR, 2002*) y SG (24.5 vs 15 meses; $P=0.001$) (*Fenaux P, 2009*)

La administración de azacitidina en pacientes con SMD de bajo riesgo no está aprobada en España actualmente, sin embargo su uso se puede justificar por tres motivos:

1. El tratamiento con azacitidina no debe diferir en su mecanismo de acción ni en el efecto sobre la fisiopatología en función del tipo de SMD.
2. Los estudios de los factores asociados a mejor respuesta en pacientes con SMD de alto riesgo sugieren que los pacientes de bajo riesgo puedan responder mejor.
3. Los datos disponibles de los ensayos clínicos publicados y la experiencia publicada de forma retrospectiva sugiere que las tasas de respuestas en pacientes con SMD de bajo riesgo son como mínimo iguales (sino superiores) a las observadas en pacientes de alto riesgo.

Azacitidina es un fármaco demetilante y las alteraciones de la metilación se han demostrado en todo el espectro de pacientes con SMD, tanto de alto como de bajo riesgo. En este sentido la eficacia (en cuanto a respuesta) del tratamiento sería similar en todos los tipos de SMD, como de hecho se ha comprobado en los dos ensayos clínicos donde el subtipo del SMD (según la clasificación FAB o WHO) no tuvo impacto en la respuesta al tratamiento (*Silverman LR, 2002*) (*Fenaux LR, 2009*)

En un estudio reciente se analizaron los factores asociados con respuesta a azacitidina en pacientes ($n=282$) con SMD de alto riesgo que recibieron el fármaco dentro del programa de uso compasivo francés. El análisis multivariado mostró que los factores asociados a peor respuesta eran: 1) haber recibido tratamiento previamente con citarabina en dosis baja, 2) presencia de más de un 15% de blastos y 3) anomalías citogenéticas (*Itzykson Y, et al. 2011*). Estos factores son menos frecuentes entre los pacientes con SMD de riesgo bajo, lo que de forma indirecta sugiere que estos pacientes se podrían beneficiar del tratamiento.

La lenalidomida, es un derivado de la talidomida, de mayor potencia y con un mejor perfil de toxicidad, especialmente en lo relativo a teratogenicidad. El mecanismo de acción no es bien conocido, pero se piensa que es multifactorial, e intervienen sus efectos anti-angiogénicos a la vez que sus propiedades inmunomoduladoras que incluyen una reducción de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y una inhibición de la activación de linfocitos T y células NK; también se ha descrito que posee acción citotóxica directa y son capaces de estimular la eritropoyesis (*Ortega J, 2007; List AF, 2007*). En estudios aleatorizados en pacientes con SMD en comparación con placebo lenalidomida ha mostrado ser mejor tanto en tasa de respuesta hematológica como de respuesta citogenética. Al tratarse de estudios que permitían el entrecruzamiento entre ramas no se constató mejora en la SG (*List AF, 2005; Raza A, 2008*). La lenalidomida ha resultado especialmente eficaz en pacientes con SMD con del 5q, especialmente en aquéllos con delección aislada, pero también en los que presentan anomalías añadidas (*List AF, 2006*). Recientemente se han publicado los resultados de un estudio en pacientes con SMD con delección del cromosoma 5q, comparando dos dosis de lenalidomida (5 y 10 mg al día durante 21 días cada 28) y un grupo que recibió placebo. Este trabajo demostró que el uso del fármaco era seguro, tanto en términos de toxicidad como de evolución a LMA, y además las dosis de 10 mg/día se asoció a mejor tasa de respuesta que los otros dos grupos. En este estudio tampoco se permitió el entrecruzamiento, por lo que no se observaron diferencias en términos de SG entre los grupos, sin embargo si se pudo demostrar que la obtención de respuesta hematológica se asoció a mejores resultados de SG (*Fenaux, P, et al. 2011*)

Los **esquemas de quimioterapia tipo LMA**, basados en el uso de citarabina y antraciclinas obtienen peores resultados que en la LMA primaria o *de novo*. Ello se debe tanto a la mayor frecuencia de cariotipos de mal pronóstico en los SMD de riesgo alto como por tratarse en general de pacientes de edad avanzada y mal estado general (*Tricot G, 1986; Wattel E, 1998*) El uso de estos esquemas de QT se debe considerar parte de un plan terapéutico más amplio que incluya un trasplante alogénico, al ser éste el único tratamiento con intención curativa y que ofrece mejores resultados que el autotrasplante (Auto-TPH) o la QT sola (*de Witte*

T, 2001) ya que su uso de forma aislada no parece aportar mejoría en cuanto a SG (Kantarjian, H. 200

Tabla 6: Tratamiento médico en los SMD.

| CLASE | FÁRMACOS | COMENTARIOS |
|--|--|--|
| INMUNOSUPRESORES | | El uso de fármacos inmunosupresores se basa en la existencia de alteraciones inmunológicas en pacientes con SMD (LT oligoclonales y autorreactivos y en la presencia en algunos SMD de características comunes con la aplasia de médula ósea. |
| | ATG | EL uso de ATG en monoterapia se asocia a alrededor de 20% de respuestas. Los predictores de respuesta son edad joven, presencia de clon de HPN, HLA DR15, médula ósea hipocelular, citogenética normal. (Killic SB 2003; Molldrem JJ 2002, Sauntharajah Y 1983, , Lim ZY 2007, Stone RM 2009) |
| | Ciclosporina | La ciclosporina se ha estudiado menos aunque también hay estudios que sugieren que su uso puede ser de utilidad en pacientes con anemia refractaria, con una M.O hipoplásica, con citogenética de buen pronóstico. (Shimamoto T 2003, Bosanova A 1998) |
| INMUNOMODULADORES | Lenalidomida | La actividad de estos fármacos, no del todo explicada, se debe a sus propiedades antiangiogénicas, a su capacidad de inmunoregulación (reduce las citoquinas pro-inflamatorias, la activación de células T y NK) , a la capacidad de estimular la eritropoyesis y a un efecto citotóxico directo (Ortega J 2007, List AF 2007) La lenalidomida ha mostrado ser eficaz en cuanto a independencia transfusional, en en un 70% de pacientes con SMD con del5q31.1, con un 70% de respuestas cito genéticas (List AF 2006). Además también resulta eficaz en SMD de riesgo bajo e intermedio-1 en un 40% de los casos (List AF 2005, Raza A 2008) |
| | Talidomida | Aunque también logra respuestas en un 30% de los casos (Raza A 2001), su uso es menor al ser más tóxica que la lenalidomida. |
| ANTIANGIOGÉNICOS-ANTIAPÓPTÓTICOS | ATO Bevacizumab | En los SMD se ha demostrado un incremento de la angiogénesis (Pruneri G 1999). El VEGF-A se ha visto implicado en la generación de neovascularización, estimulación de los blastos y hemopoyesis ineficaz (Bellamy WT 2001) El uso de fármacos antiangiogénicos intenta contrarrestar estos efectos. |
| INHIBIDORES FARNESIL-TRANSFERASA | Tipifarnib Lonafarnib | Esta familia de fármacos se han desarrollado para inhibir la farnesiltransferación de Ras, un gen ,mutado en gran cantidad de tumores y hasta en un 20% de SMD (Reuter CW 2000) |
| INHIBIDORES DE ACETILACIÓN DE HISTONAS | Ac. Valproico Fenilbutirato SAHA | El empleo de estos fármacos se basa en la importancia de la acetilación de las histonas en la regulación de la transcripción y de su relación con metilación del DNA (Marks 2001) En la actualidad se están probando en combinación con agentes demetilantes (Soriano A.O 2007, García-Manero G 2008) |
| AGENTES DEMETILANTES | | Son análogos a la pirimidina, que son capaces de inhibir la ADN metiltransferasa y de esta forma revertir la hipermetilación a la que están sujetos algunos genes supresores de tumores. Al demetilarse, estos genes recuperan su actividad normal. |
| | Azacitidina | La azacitidina ha demostrado mejorar la supervivencia y reducir la transformación leucémica en pacientes con SMD, en comparación con el mejor tratamiento de soporte. Además se asocia a mejor calidad de vida. La tasa de respuesta global es alrededor del 60%, con un alargamiento de la SG en torno a 9 meses. (Fenaux P 2009, Silverman LR 2002, Silverman LR 2006, Kaminskans E 2005, Kornblith AB 2002) |
| | Decitabina | Ha logrado mejorar la supervivencia y reducir la transformación leucémica en comparación con el mejor tratamiento de soporte (Kantarjian HK 2006) y en comparación con quimioterapia intensiva (Kantarjian HK 2007). In vitro muestra mayor potencia que la Azacitidina (Leone G 2002) |

El trasplante alogénico como tratamiento curativo en la LMA y el SMD

Reseña histórica

Aunque los primeros intentos de uso clínico de M.O datan de 1939 (*Osgood EE, 1939; Morrison M, 1940*), es una publicación de Jacobson en 1949 la que da fundamento a la investigación sobre Alo-TPH (*Jacobson LO, 1949*). En este trabajo en un modelo murino se demostró que los ratones podían sobrevivir a dosis de RT letales si el bazo era exteriorizado y protegido de la radiación. Aunque inicialmente se estableció cierta discusión sobre si eran factores celulares o humorales los responsables de la supervivencia de los ratones, el posterior trabajo de Lorenz (*Lorenz E, 1951*) demostró que era la infusión de células la que permitía a los ratones sobrevivir a las dosis letales de irradiación.

La aplicación del Alo-TPH en modelos murinos de leucemia se llevo a cabo por primera vez pocos años después; en 1956, Barnes publicó un trabajo en el que trataba a ratones con dosis letales de radiación seguida por la infusión de células de médula ósea (*Barnes DWH, 1956*). De forma prácticamente paralela se pusieron en marcha los primeros intentos en pacientes con enfermedades en fase muy avanzada, sin embargo la mayoría de estos intentos resultaron en un fallo de injerto primario (*Thomas ED, 1957; Bortin MM, 1970*). Finalmente en 1959 Thomas describió un caso de un paciente con leucemia en fase muy avanzada que recibió una dosis mieloablativa de radioterapia seguida de la infusión de M.O de su hermano gemelo. El resultado fue considerado un éxito, ya que por un lado la infusión de M.O logró que el paciente recuperase la hematopoyesis, cosa que no era esperable por si misma después de la dosis de radioterapia y además se observó un periodo de remisión de la leucemia de 4 meses, lo que demostró la eficacia de la estrategia terapéutica, aunque posteriormente el paciente falleció por recidiva de la enfermedad (*Thomas ED, 1959*).

Los dos problemas más importantes en estas fases iniciales, tanto en modelo animal como en la aplicabilidad a humanos fue la elevada incidencia de fallo de injerto y el desarrollo de enfermedad injerto contra el receptor (EICR) (entonces conocida como enfermedad secundaria), ambos en relación con el

desconocimiento del HLA. La descripción del sistema HLA y el reconocimiento de la necesidad de que donante y receptor fuesen compatibles para estos antígenos fue de vital importancia para mejorar los resultados posteriores del trasplante (*Storb R, 1970; Singal DP, 1969*).

El efecto injerto contra leucemia

Aunque inicialmente el Alo-TPH se entendió como una estrategia para superar el efecto mieloablativo de la dosis alta de quimio-radioterapia, ya en la década de los 70 se describió el efecto injerto contra leucemia (EICL) (*Weiden PL, 1979 y 1981*) que posteriormente se ha confirmado en diferentes contextos (*Kolb HJ, 1990 y 2004; Slavin S, 1996; Martino R, 2004*).

La EICL se sustenta en diversos hallazgos:

- 1) La incidencia de recidiva en el trasplante singénico (en el que el donante y receptor son genéticamente idénticos al tratarse de gemelos univitelinos), es mayor que la observada en trasplantes entre hermanos HLA idénticos no gemelos, lo que sugiere que son factores externos a la enfermedad y al acondicionamiento los que determinan esta mayor incidencia de recidiva (*Fefer A, 1987*).
- 2) La depleción de linfocitos T (LT) en el trasplante alogénico, se asocia a una menor incidencia de EICR pero también a una mayor frecuencia de recidivas, lo que sugiere que son los LT los responsables de ambos efectos, el EICR y el EICT (*Ho V, 2001*)
- 3) El uso de diferentes formas de manipulación de la inmunidad como son la retirada de fármacos inmunodepresores o la infusión de linfocitos T del donante es capaz de lograr remisiones en pacientes con leucemia (*Kolb HJ, 1995*)
- 4) El desarrollo de EICR se asocia a una menor incidencia de recidiva, lo que sugiere que la actividad de las células derivadas del donante frente a las células del receptor tiene además del efecto negativo de la EICR un efecto positivo antitumoral (*Horowitz MM, 1990*)

Trasplante alogénico en Leucemia Mieloide Aguda

La realización de Alo-TPH en la LMA sigue en continuo aumento desde hace más de 10 años, tanto en pacientes en primera RC como en aquéllos en fases más avanzadas de la enfermedad. La indicación en pacientes tras una recidiva (previa obtención de una nueva RC) se acepta de forma prácticamente universal, sin embargo el uso del Alo-TPH en pacientes en primera línea es motivo de múltiples debates. Hasta la fecha se han publicado diversos estudios aleatorizados, en la tabla 6 se recogen los más relevantes. La aleatorización fue en todos los casos genética, de forma que los pacientes con un donante familiar recibieron un Alo-TPH, y los que no dispusieron de este donante se trataron con un Auto-TPH o quimioterapia de consolidación. Globalmente todos los trabajos mostraron una reducción en la recidiva en los pacientes que recibieron un Alo-TPH, sin embargo los datos fueron más controvertidos en lo referente a la SG (SG) y a SLE, especialmente en los pacientes de riesgo intermedio (citogenética normal o con alteraciones que no son de buen o mal pronóstico) donde el beneficio de una menor recidiva puede verse contrarrestado por una mayor mortalidad asociada al trasplante.

Tabla 7: Principales estudios comparando donante vs no donante en LMA con asignación genética.

| REF (Año) | Número Pacientes | | SG | SLE: % (95% IC) |
|---------------------------------|------------------|---|---|---|
| | Donante | No donante | HR (95% IC); P | HR (95% IC); P |
| GOELAM (Harousseau, 1997) | 73 | 507 (219 146 (75 Auto-TPH 71 QT) | Alo-TPH: 44.5% +/- 5.5% No Alo-TPH: 38 +/- 4% HR no disponible P=0.7 | Alo-TPH: 44.5% +/- 5.5% No Alo-TPH: 38 +/- 4% HR no disponible P=0.6 |
| MRC (Burnett AK, 2002) | 419 | 1055 644 | Don: 56% No Don: 50% OR= 0.88 (0.74-1.04) P ¼ 0Æ1] | Don:50% No Don: 42% OR=0.82 (0.70-0.96) P= 0.001] |
| EORTC/GIMEMA (Suciu S, 2003) | 293 | 734 (<46 años, en 1ª RC) 441 | Alo-TPH : 58.3% No Alo: 50.8% HR 0.84 (0.67-1.08) P=0.18 | Alo-TPH : 52.2% No Alo: 42.2% HR 0.8 (0.6-0.99) P=0.044 |
| BGMT (Jourdan E, 2005) | 182 | 472 en 1ª RC 131 QT 159 Auto-TPH | Alo-TPH : 51% (44-59%) No Alo-TPH: 43% (38-49%) HR no disponible P=0.11 | Alo-TPH : 48% (41-56%) No Alo: 40% (34-47%) HR no disponible P=0.03 |
| HOVON (Cornelissen JJ, 2007) | 326 | 1032 (<55 años, 1ªRC) 599 | Don: 54 +/-3 No Alo: 46 +/-2 HR: 0.85 (0.7-1.03) P=0.09 | Don: 48 +/-3 No Alo: 37 +/-2 HR: 0.71 (0.59-0.65) P<0.001 |

+ Se consideraron evaluables los pacientes en remisión completa y a partir de estos se incluyó en el grupo de Alo-TPH los que tenían un hermano HLA compatible y se aleatorizó el resto a quimioterapia vs trasplante autólogo.#Por diferentes motivos solo 219 pacientes recibieron el tratamiento planeado.¹Intervalo de confianza no reportado.

Además de estos trabajos, hay hasta la fecha dos meta-análisis publicados:

El primero se publicó en 2005 e incluyó 5 estudios que compararon el Alo-TPH con el Auto-TPH y/o la QT, en pacientes con LMA en primera RC entre 10 y 55 años de edad (*Yanada M, 2005*). Los 5 estudios incluidos realizaron un análisis por intención de tratamiento en los que el Alo-TPH se ofreció a los pacientes con un hermano HLA idéntico. Se incluyeron un total de 3100 pacientes (1151 en el grupo de Alo-TPH y 1949 en el grupo de QT y/o Auto-TPH). A pesar de que ninguno de los estudios incluidos mostró ventaja en términos de SG, el meta-análisis puso de manifiesto que el Alo-TPH se asoció a una ventaja en SG en el conjunto de los pacientes (Hazard Ratio de 1.15 (IC 95%: 1.01-1.32, P=0.037); este efecto fue especialmente relevante en los pacientes de alto riesgo citogenético, mientras que no lo fue en los pacientes con citogenética de pronóstico favorable o intermedio.

El grupo HOVON/SAKK, publicó en 2007 un meta-análisis que incluyó sus propios resultados y los de otros 3 estudios recientes, lo que reunió 3103 pacientes (1134 en el grupo de alo-TPH y 1969 en el de no Alo-TPH) En este trabajo los pacientes con citogenética de riesgo adverso o intermedio se beneficiaron de recibir un trasplante alogénico. Además se estimó que el beneficio del trasplante alogénico fue evidente cuando el riesgo de recidiva superó el 35%, de forma que únicamente en los pacientes con citogenética de riesgo favorable se esperaría una probabilidad de recidiva inferior con quimioterapia y por lo tanto no serían candidatos a Alo-TPH (*Cornelissen JJ, 2007*)

Recientemente se ha dado un paso más allá en el análisis del riesgo genético al incorporar el estudio molecular. En este sentido la identificación de determinadas anomalías moleculares es útil para identificar un grupo de pacientes de riesgo citogenético intermedio que puedan sustraerse del riesgo del Alo-TPH. Los tres genes que se estudian de forma habitual son FLT-3, NPM1 y CEBPA. La presencia de la duplicación interna en tandem del gen FLT3 se asocia a riesgo alto de recidiva, mientras que la presencia de mutaciones en los otros dos genes, en ausencia de mutación de FLT3 se asocia a riesgo bajo. La realización de un Alo-TPH se asocia a mejores resultados en el primer grupo, mientras que no aporta beneficio en el segundo grupo, donde el tratamiento con QT en dosis alta o el Auto-TPH ofrece los mismos resultados que el Alo-TPH (*Schlenk RF, 2008*).

Trasplante hematopoyético alogénico en síndromes mielodisplásicos

El Alo-TPH es todavía la única opción potencialmente curativa para pacientes con SMD. La falta de donantes compatibles y la edad avanzada han limitado el acceso de los pacientes a este tratamiento hasta hace pocos años. El incremento en el número de donantes no emparentados y la mejora en los resultados obtenida en los últimos años, con la de las técnicas de biología molecular aplicadas al estudio del HLA y el mejor tratamiento de soporte, así como la introducción de los Alo-TIR han permitido que un mayor número de pacientes se consideren para un Alo-TPH. Pese a ello, todavía quedan muchas preguntas no resueltas en torno al papel del Alo-TPH en los pacientes con SMD; algunas de ellas son:

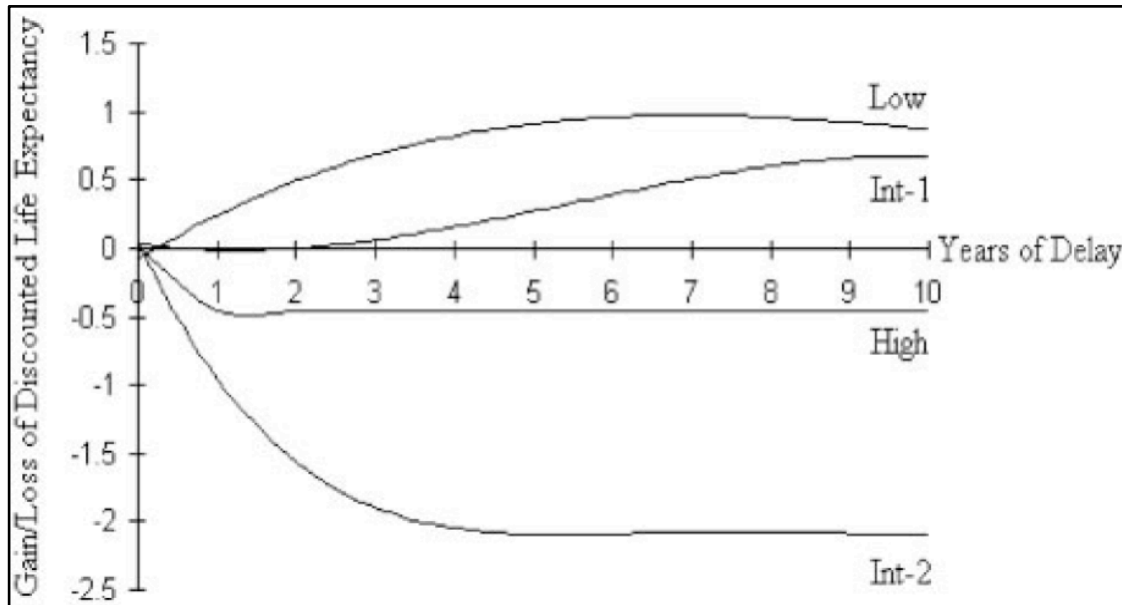
- 1) ¿Qué pacientes son candidatos a trasplante alogénico?.
- 2) ¿Cuál es el momento óptimo para el trasplante?
- 3) Se debe administrar algún tratamiento pretrasplante y cuál?
- 4) ¿Cuál es el mejor tipo de acondicionamiento? (esto último se discutirá en el apartado 4.3).

¿Qué pacientes son candidatos a trasplante y en qué momento?

Dado que el Alo-TPH es la única opción curativa para los pacientes con SMD, en general se deberían considerar como potenciales candidatos a todos ellos, siempre que su edad y su estado general lo permitan. Lo realmente importante es definir bien el momento óptimo para ofrecer el trasplante, con la intención de obtener la mejor SG, ya que la esperanza de vida y el riesgo de transformación en LMA es diferente según el tipo de SMD.

Esta cuestión se ha planteado en un estudio retrospectivo de 674 pacientes que evaluó 3 estrategias: a) trasplantar en el momento del diagnóstico b) trasplantar en el momento de la transformación leucémica y c) trasplantar en un intervalo dado a partir del diagnóstico. El estudio concluyó que, en los pacientes con SMD con riesgo Intermedio-2 y alto según el IPSS, el trasplante en el momento del diagnóstico ofreció los mejores resultados, mientras que para los pacientes de los grupos de bajo riesgo o riesgo intermedio-1, la SG fue mejor si trasplantaron lo más tarde posible, pero antes de la transformación leucémica (Figura 2)(Cutler CS, 2004).

Figura 2: Impacto del trasplante en la ganancia o pérdida de esperanza de vida en los 4 tipos de SMD según el IPSS en relación al momento del trasplante.



Tomado de *Cutler CS. A decision analysis of allogeneic bone marrow transplantation for myelodysplastic syndromes. Delayed transplantation for the low-risk myelodysplasia is associated with improved outcome. Blood 2004; 104:579-585, 2004.* En esta gráfica se observa como en los pacientes con SMD de riesgo bajo o intermedio-1, el retraso en el momento del trasplante se asoció a una ganancia en años de vida, mientras que en que los pacientes con riesgo intermedio-2 o alto el retraso en el momento del trasplante se asoció a pérdida en años de vida.

¿Cuál es el papel de la quimioterapia previa al trasplante?

La discusión sobre el papel de la QT antes de proceder al TPH sigue abierta. Por un lado, el uso de QT podría aportar ciertas ventajas como reducir la carga tumoral pretrasplante y con ello las recidivas tras el procedimiento. Además el tratamiento podría mejorar las citopenias del paciente y dar tiempo a la identificación de un donante. Por otra parte, el uso de QT pre-TPH también tiene ciertas desventajas, como la baja probabilidad de alcanzar remisión completa (30-60%), que además ésta es en general de corta duración (inferior a 12 meses) y que el tratamiento tiene una mortalidad en torno al 25%; adicionalmente, un porcentaje de pacientes no podrá recibir el Alo-TPH por comorbilidades secundarias a la terapia.

El motivo fundamental para la realización de tratamiento previo al trasplante sería la reducción de la cifra de blastos. Aunque no se han realizado estudios prospectivos, se ha visto que la presencia de una mayor cantidad de blastos en la M.O o en sangre periférica se ha asociado a mayor probabilidad de recidiva tras el trasplante y peor SG. En base a ello se suele recomendar la realización de una

quimioterapia previa al trasplante cuando el paciente presenta una cifra de blastos superior al 5-10% (*Sierra J, 2002, Yakoub-Agha, 2000*). Por otra parte los pacientes que tras recibir tratamiento con QT de inducción no alcanzan RC son los que presentan un peor pronóstico tras el Alo-TPH, incluso peor que aquéllos que no recibieron tratamiento pre-trasplante (*Martino R, 2006*). Con estos datos, se considera que los pacientes con menos de un 10% de blastos pueden considerarse candidatos a trasplante directo, mientras que aquéllos con más de un 10% de blastos (o un cariotipo de mal pronóstico) serían subsidiarios de tratamiento previo para reducir la carga de enfermedad.

Por otra parte, una opción reciente es usar azacitidina como tratamiento previo al trasplante. Aunque la experiencia es todavía muy limitada, parece que su uso no se asocia a problemas durante el trasplante (*Field T, 2009*). Las ventajas potenciales de la azacitidina serían una menor toxicidad y una posible mejor respuesta en pacientes de alto riesgo citogenético, mientras que en contra sería una menor tasa de RC, que es una de las finalidades del tratamiento pre-trasplante. Un estudio retrospectivo que incluía pacientes que se realizaron un trasplante tras haber recibido previamente tratamiento con quimioterapia tipo LMA o azacitidina no demostró diferencias entre los dos grupos en términos de mortalidad, recidiva o supervivencia, sugiriendo que ambas opciones pueden ser útiles (*Damag J, 2012*)

El trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida

Clásicamente se consideraba que el éxito del Alo-TPH se fundamentaba en 3 pilares:

- 1) El uso de dosis altas de quimio-radioterapia, que tenía una triple función: eliminar completamente la neoplasia hematológica subyacente, "hacer espacio físico" y producir una inmunoblación que impidiera rechazar las células del donante.
- 2) La infusión de células del donante para rescatar la hematopoyesis.
- 3) Evitar el desarrollo de enfermedad injerto contra huesped (EICR) grave y el efecto antitumoral de la celularidad inmunocompetente del injerto.

La necesidad de acondicionamiento intensivo limitaba clásicamente el acceso al trasplante debido a la alta mortalidad relacionada con el tratamiento (MRT), de forma que solo los pacientes jóvenes (< 40 años) se consideraban candidatos a esta estrategia.

La mejora en el conocimiento de los factores implicados en el éxito del trasplante permitió el desarrollo de esquemas de acondicionamientos de menor intensidad, conocidos como de intensidad reducida. Los avances que sustentaron su introducción fueron:

- 1) El posicionamiento del EICT como mecanismo fundamental de acción del trasplante alogénico y la hipótesis de que esta capacidad antineoplásica sería suficiente para controlar la enfermedad de base.
- 2) El reconocimiento que no eran necesarias dosis altas de quimio-radioterapia en el acondicionamiento para lograr el injerto, sino que una suficiente inmunosupresión podría ejercer el mismo papel.

Modelos animales de acondicionamiento de intensidad reducida

Los estudios en modelos murinos, mostraron que la combinación de ICT en dosis subletal y no mieloablativa con diferentes anticuerpos monoclonales (AcM) frente a linfocitos T permitían alcanzar un injerto hematopoyético estable (*Cobbold SP 1986, Li H 1996, Colson YL 1995, Colson YL 1996*). Por otra parte, el uso de irradiación tímica permitió reducir todavía más la dosis de ICT, en combinación con AcM anti-linfocito T o AcM anti señal co-estimuladora (anti-CD154 e Ig frente CTLA4)

también permitieron un injerto estable y prolongado (*Sharabi Y 1992, Sykes M 1997, Wekerle T 1998*). Slavin mostró que el uso de irradiación linfóide total (ILT) incluyendo bazo, ganglios y timo era suficiente para alcanzar un injerto prolongado sin signos de EICR. (*Slavin S, 1978*) En conjunto todos estos estudios sugirieron que el mecanismo fundamental para permitir el injerto hematopoyético no era la mieloablación sino una inmunosupresión profunda del paciente.

El grupo de Seattle, realizó experimentos similares en modelos caninos. Inicialmente lograron establecer que la dosis mínima de ICT necesaria para garantizar el injerto hematopoyético estable (administrada de forma aislada) era de 9.2 Gy (*Storb R, 1989*). Con la hipótesis de que el uso de inmunodepresores post-trasplante podría reducir la dosis de ICT, ellos combinaron dosis menores de ICT con diferentes fármacos como ciclosporina (CsA), micofenolato mofetil (MMF), metotrexate (MTX) y rapamicina y observaron que la inclusión de estos fármacos permitía reducir la dosis total de ICT a 4.5 Gy con la adición de CsA, y aún más, a 2 Gy con la combinación de CsA con MMF o MTX (*Storb R 1997, Yu C 1995, Yu C 1998*), logrando el injerto de las células del donante. Igual que en los experimentos en modelos murinos, el uso de agentes que bloquearon la señal coestimuladora permitió reducir todavía más la dosis de ICT (*Storb R, 1999*) Por último, se investigó el uso de radio-inmunoterapia con la intención de substituir la ICT. Los dos fármacos estudiados en este sentido (Bi^{213} unido a AcM frente TCR o CD 45) lograron un injerto hematopoyético estable (*Sandmaier B, 2002*)

En conjunto, estos estudios confirmaron que no eran necesarias dosis elevadas de radioterapia (ni quimioterapia) para lograr un injerto hematopoyético sostenido; de esta forma se abría el camino a futuros estudios que buscasen inmunosupresión profunda con menor toxicidad extramedular que la clásicamente asociada a los regímenes mieloablativos. Serían las células inmunes derivadas de los progenitores alogénicos las responsables de la curación del paciente mediante el EICT (*Giralt S, 1997*).

Desarrollo clínico

Con estos datos en mente, diversos grupos desarrollaron esquemas de acondicionamiento atenuado que se empezaron a denominar “acondicionamientos de intensidad reducida”, “acondicionamientos no mieloablativos” o más popularmente “mini-alotrasplantes”. De los tres términos el más correcto parece el primero, ya que no todos los acondicionamientos son realmente no mieloablativos y el término de mini-alotrasplante no parece muy correcto, ya que se trata de un trasplante completo y que los problemas en relación con la EICR y las infecciones son muy similares a cuando se administra un acondicionamiento convencional.

En los primeros estudios se incluyeron pacientes que no se consideraban candidatos a recibir un trasplante convencional por su alto riesgo de MRT y que presentaban en general enfermedades hematológicas en fases muy avanzadas, en muchos casos con enfermedad activa en el momento del trasplante. En general, en estos primeros estudios los donantes fueron familiares HLA idénticos.

El esquema estudiado en modelos caninos fue aplicado a pacientes por el mismo grupo de Seattle. Se administraron dosis de ICT de 2 Gy e inmunodepresión posterior con CsA y MMF. Este esquema se asoció a fallo de injerto secundario en un 20% de pacientes, por lo que se añadió posteriormente fludarabina en dosis de 90 mg/m², con lo que el fallo de injerto se redujo a un 3%, una proporción que no difiere a la observada en pacientes que reciben un Alo-TPH con acondicionamiento convencional (*McSweeney, 2001*). En consecuencia, fue este último el esquema que se adoptó desde entonces y se considera como el esquema clásico de intensidad reducida, y uno de los pocos realmente no mieloablativo.

Los acondicionamientos más usados desde la introducción de los primeros esquemas han consistido en la combinación de un análogo de las purinas (generalmente fludarabina en dosis entre 90 y 180 mg/m², o en algunos casos cladribina) en combinación con un agente alquilante (melfalán en dosis de 70-140 mg/m², busulfán en dosis de 8-10 mg/kg o ciclofosfamida en dosis de 900-2000 mg/m²), en ocasiones junto a ATG o alemtuzumab (*Giralt S, 1997; Khouri IF, 1998, Slavin S, 1998; Childs R, 1999; Kottaridis PD, 2000; Nagler A, 2001*). La inmunodepresión post-trasplante consistió generalmente en CsA asociada a MMF o MTX.

Introducción: Trasplante Alogénico de Intensidad Reducida.

Por su parte, los grupos de Boston y Stanford, se decantaron por un acondicionamiento basado en irradiación tímica (IT) o irradiación linfode total (ILT) con ATG y posterior inmunodepresión con CsA y MMF. (*Spitzer TR, 2000; Lowsky R, 2005*)

Globalmente de estos trabajos iniciales se extrajeron las siguientes conclusiones:

1. Los acondicionamientos denominados de intensidad reducida lograron un alto porcentaje de injerto hematopoyético estable a lo largo del tiempo.
2. La MRT fue inferior a la esperable para este grupo de pacientes de alto riesgo, no candidatos a recibir un trasplante con acondicionamiento convencional.
3. A pesar de las fases avanzadas en que se realizaron la mayor parte de los trasplantes, algunos pacientes se mantuvieron libres de enfermedad a largo plazo, lo que confirmó que el desarrollo de EICT fue de gran importancia en la eliminación de la enfermedad de base.

Para reducir la EICR aguda, un problema también en los Alo-TIR, con una incidencia similar a la reportada tras acondicionamiento convencional, el grupo de Londres introdujo el alemtuzumab en el acondicionamiento (un AcM frente a CD52 que produce una profunda depleción de LT) en dosis de 100 mg los 5 días previos al trasplante. Con ello se redujo de forma drástica la incidencia de EICR aguda, en especial sus formas graves, que se observaron sólo de forma excepcional. Por el contrario, las incidencias de fallo de injerto, recidiva de la enfermedad e infecciones fueron superiores y, en conjunto, los resultados en cuanto a SG y SLE fueron similares a los observados sin alemtuzumab (*Kottaridis PD, 2000; Chakraverty R, 2002*). No hay estudios prospectivos que comparen la depleción T con ATG o alemtuzumab en el contexto del Alo-TIR, aunque los datos disponibles no sugieren que existan diferencias entre ambos en términos de supervivencia. En una comparación retrospectiva de tres esquemas de acondicionamiento basados en fludarabina y busulfán, un grupo sin depleción T, otro con ATG y un tercero con alemtuzumab, no se evidenciaron diferencias en la SG ni en la SLE (*Valcárcel D, 2007*). El grupo con alemtuzumab tuvo menor incidencia de EICH aguda y crónica, pero requirió más frecuentemente ILD para controlar la enfermedad de base y presentó más reactivaciones de CMV (*Perez-Simon JA, 2002*).

Introducción: Trasplante Alogénico de Intensidad Reducida.

Por otra parte, en algunas patologías concretas parece que el uso de alemtuzumab se asocia a mayor riesgo de progresión precoz de la enfermedad tras el trasplante y peores resultados globales en términos de SG, como se ha observado en pacientes con mieloma múltiple (*Perez-Simón JA, 2002*) y leucemia linfática crónica (*Michalet M, 2010, Dreger P, 2010*); por tanto, su uso parece desaconsejable en esas enfermedades.

Una vez demostrada la capacidad de injerto con estos esquemas de acondicionamiento, se extendió su uso a los trasplantes de donante no emparentado y a los trasplantes con una diferencia HLA; se confirmó nuevamente que dichos esquemas eran capaces de lograr el injerto hematopoyético estable también en estas circunstancias, con una MRT aceptable y con largos supervivientes (*Kottaridis PD, 2000; Spyridonidis A 2005; Sykes M, 1999; Luznick L, 2008; Bertz H, 2003*)

Objetivos

El **objetivo principal** de esta tesis doctoral es el análisis de la eficacia de un esquema propio de acondicionamiento de intensidad reducida, seguido de trasplante de progenitores hematopoyéticos de donante familiar, en pacientes con neoplasias hematológicas y especialmente en aquéllos afectos de LMA y SMD.

Para ello se han fijado diversos **objetivos concretos**, objeto cada uno de ellos de un estudio específico:

- 1.- **Estudio de la mortalidad asociada al trasplante** en pacientes con neoplasias hematológicas que recibieron un Alo-TIR y su comparación con la observada con acondicionamiento convencional.
- 2.- **Comparación del Alo-TIR vs el Alo-TPH con selección CD34+** y acondicionamiento convencional, como estrategias ambas para reducir la MRT.
- 3.- Estudio de la **eficacia del Alo-TIR en pacientes con LMA y SMD de alto riesgo y análisis de los factores implicados en los resultados**, mediante el análisis de la SG, SLE, recidiva y MRT. Estudio del impacto del desarrollo de la EICR (como marcador de EICT) en los pacientes a los que se les realizó un Alo-TIR por LMA o SMD.

Justificación de la unidad temática

Los tres trabajos presentados en esta tesis doctoral siguen un hilo argumental común en torno a la aplicabilidad clínica del Alo-TIR en las enfermedades hematológicas y especialmente en las LMA y los SMD.

Este proyecto de investigación se inició con un trabajo que estudió la evolución del quimerismo tras el Alo-TIR, cuyo resultado se publicó en 2003 en *Bone Marrow Transplantation* y constituyó el proyecto de investigación previo a esta tesis doctoral.

El primero de los trabajos que conforman esta tesis estuvo destinado a comparar la mortalidad asociada al procedimiento en el Alo-TIR con el Alo-TPH con acondicionamiento convencional y se publicó en 2005.

En el segundo trabajo se analizó el resultado del Alo-TIR en pacientes con LMA y SMD con un esquema de acondicionamiento de intensidad reducida homogéneo y largo seguimiento, lo que dio como resultado un artículo publicado en 2008.

Finalmente, en el tercer trabajo se comparó el Alo-TIR con el Alo-TPH convencional con selección CD 34 positiva, que es otra de las estrategias que se usan con la intención de reducir la MRT mediante la reducción de la EICR aguda y se publicó en 2008.

Resultados

Como resultado del trabajo de investigación clínica que conforma esta tesis doctoral se han publicado los siguientes artículos originales.

Artículo 1: *Valcarcel D, Martino R, Sureda et al. "Conventional versus reduced-intensity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies" European Journal of Haematology 2005; 74:144-151.*

Artículo 2: *Valcarcel D, Martino R, Caballero D et al. Sustained remissions of high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic transplantation: Chronic graft versus host disease is the strongest factor improving survival. Journal of Clinical Oncology 2008; 26: 577-584*

Artículo 3: *Martino R, Valcarcel D, Brunet S et al "Comparable non-relapse mortality and survival after HLA-identical sibling blood stem cell transplantation with reduced or conventional-intensity preparative regimens for high-risk myelodysplasia or acute myeloid leukemia in first remission". Bone Marrow Transplantation 2008; 41:33-38.*

Artículo 4 (Anexo 1): *Valcarcel D, Martino R, Caballero D et al. "Chimerism analysis following allogeneic Peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning" Bone Marrow Transplantation 2003; 31: 387-392.*

Objetivo 1: Estudio de la mortalidad asociada al trasplante en pacientes con neoplasias hematológicas que recibieron un Alo-TIR y su comparación con los tratados con Alo-TPH con acondicionamiento convencional.

Resumen:

En este trabajo estudiamos la aplicabilidad del trasplante con acondicionamiento de intensidad reducida en la práctica clínica, especialmente en lo que se refiere a su capacidad para reducir la mortalidad relacionada con el trasplante (MRT). Para ello comparamos el resultado del trasplante en dos poblaciones de pacientes que se trasplantaron en el mismo periodo en nuestro centro (un grupo que recibió un trasplante con acondicionamiento convencional (Alo-Conv) y otro con acondicionamiento de intensidad reducida (Alo-TIR), y analizamos los factores asociados con la mortalidad relacionada con el trasplante. Se incluyeron 157 pacientes, de los que 57 recibieron un trasplante de intensidad reducida. Todos los pacientes tenían neoplasias hematológicas y 99 de ellos estaban en fase no precoz.

Los pacientes del grupo que recibió un Alo-TIR eran de mayor edad y con fases más avanzadas de la enfermedad. Tras un seguimiento mediano de 28 meses, la MRT en el grupo Alo-Conv vs. el Alo-TIR fue del 30% [Intervalo de confianza del 95% (IC 95%) 22–41%] vs. el 22% (IC 95%: 13–37%), respectivamente, y aunque la diferencia no resultó estadísticamente significativa en el análisis univariado, el acondicionamiento si fue uno de los factores con impacto en el análisis multivariado. Los factores asociados a mayor MRT fueron Alo-Conv vs. Alo-TIR (Riesgo relativo (RR) 5.4; IC 95%: 2.3–12.8; $P < 0.001$), edad >45 años vs. <45 años (RR 5; IC 95%: 2.4–10.8; $P < 0.001$), segundo trasplante vs. primer trasplante (RR 2.8; IC 95%: 1.3–6.3; $P = 0.01$) y trasplante no deplecionado de linfocitos T vs. el uso de depleción T (RR 2.7; IC 95%: 1.3–5.8; $P = 0.009$). La supervivencia global a los dos años fue del $52.5\% \pm 10.4\%$ vs el $59\% \pm 16.8\%$, en los grupos Alo-Conv y Alo-TIR, respectivamente. Los factores asociados con peor supervivencia global en el análisis multivariado fueron: Alo-Conv vs. Alo-TIR (RR 3.4; IC 95%: 1.7–6.9; $P = 0.001$); edad >45 años vs. <45 años (RR 2.5; IC 95%: 1.4–4.5; $P = 0.002$) y diagnóstico (no LMC vs. LMC) (RR 2.6; IC 95%: 1.2–5.7; $P = 0.02$).

La conclusión de este trabajo fue que la introducción de los Alo-TIR se asoció a menor MRT en pacientes de alto riesgo (edad avanzada, segundos trasplantes,

presencia de comorbilidades, etc) y esto permitió mejorar los resultados de supervivencia global.

Justificación

En un trabajo previo (presentado en forma de anexo en la presente tesis doctoral) habíamos comprobado que el esquema de intensidad reducida diseñado era capaz de lograr el injerto hematopoyético, tanto a corto como a largo plazo, y por lo tanto esta plataforma de acondicionamiento de intensidad reducida podría ser aplicable en la práctica.

El principal objetivo de los acondicionamientos de intensidad reducida (Alo-TIR) es reducir la MRT, especialmente la que se produce a corto plazo como consecuencia de la toxicidad del acondicionamiento, por lo que la intención de este primer trabajo fue comparar los resultados obtenidos en nuestro centro en los pacientes que recibieron un trasplante alogénico con Alo-TIR y compararlos con los resultados del trasplante con acondicionamiento convencional (Alo-CONV) para evaluar si se producía una reducción de la MRT y estudiar las variables asociadas a la misma.

Pacientes y métodos:

Se incluyeron de forma consecutiva 157 pacientes adultos (104 hombres y 53 mujeres) que habían recibido un trasplante alogénico (Alo-TPH) de un hermano HLA idéntico en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, entre los años 1995 y 2002. En enero de 1999 se inició en nuestro centro el programa de Alo-TIR, en pacientes de edad superior a 45 años y/o que habían recibido un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos previamente. Los pacientes dieron su consentimiento informado para la inclusión en un ensayo prospectivo multicéntrico que había sido aprobado por el Ministerio de Sanidad y el Comité Ético de nuestra institución.

El seguimiento mediano de los pacientes vivos fue de 28 meses (rango 3-94 meses) en el grupo que recibió un trasplante convencional y de 15 meses (rango 3-37) en el grupo que recibió acondicionamiento de intensidad reducida.

La edad mediana fue de 46 años (rango 16-66) para toda la serie, menor en el grupo de acondicionamiento convencional (Alo-CONV, N=100) que en el de intensidad reducida (Alo-TIR, N=57) (39 vs. 51 años, respectivamente; $P < 0.001$); además, el grupo que recibió Alo-CONV incluyó más pacientes en fase precoz que

Objetivo 1: Trasplante convencional vs Alo-TIR.

el grupo de Alo-TIR (50% vs. 14%, respectivamente; $P < 0.001$). Las características de los pacientes se detallan en la tabla 7.

Tabla 8: Características de los pacientes

| | CONVENCIONAL (N=100) | INTENSIDAD REDUCIDA (N=57) | P |
|---|-------------------------|----------------------------------|--------|
| Edad: mediana (rango), años | 39 (16-63) | 51 (24-66) | <0.001 |
| Edad >45 años. N (%) | 43 (43) | 47 (82) | <0.001 |
| Sexo (mujer). N (%) | 32 (32) | 21 (37) | NS |
| Diagnóstico. N(%) | | | |
| LMA/SMD | 29 (29)/12 (12) | 4 (7)/ 7 (12) | |
| LLA | 16 (16) | 2 (3) | |
| LMC/MF | 23 (23) | 4 (7)/ 1 (2) | |
| LNH | 11 (11)/1 (1) | 16 (28)/ 5 (9) | |
| MM | 8 (8) | 12 (23) | |
| LH | - | 5 (9) | |
| Fase precoz de enfermedad. N (%) | 50(50) | 8 (14) | <0.001 |
| Fuente progenitores (M.O). N (%) | 28 (28) | 1 (2) | <0.001 |
| Depleción Linfocitos T. N (%) | 45 (45) | 0 | <0.001 |
| Trasplante previo. N (%) | 6 (6) | 22 (39) | <0.001 |
| Serología CMV negativa en donante y receptor. N (%) | 6 (6) | 6 (11) | <0.001 |
| Seguimiento (meses). N (%) | 28 (3-94) | 15 (3-37) | <0.001 |

N=Número, LMA: Leucemia mieloide aguda, SMD: Síndrome mielodisplásico, LLA: Leucemia linfoblástica aguda, LMC: Leucemia mieloide crónica, MF: Mielofibrosis, LNH: Linfomas no-Hodgkin, MM: Mieloma múltiple, LH: Linfoma de Hodgkin. CMV: Citomegalovirus. NS: No significativo

Acondicionamientos, profilaxis de enfermedad injerto contra huésped y tratamiento de soporte.

Los esquemas de acondicionamiento utilizados están detallados en la tabla 8. El tipo de acondicionamiento de intensidad reducida utilizado dependió de la enfermedad de base, de forma que se usó busulfán en las neoplasias mieloides y melfalán en las linfoides, en ambos casos con fludarabina. El acondicionamiento

Objetivo 1: Trasplante convencional vs Alo-TIR.

convencional se basó en dosis altas de ciclofosfamida en el 96% de los pacientes, acompañada de irradiación corporal total en el 74% de los casos (añadiéndose etopósido en 11% y tiotepa en 5%) o busulfán en 17% en dosis plenas.

Tabla 9: Acondicionamientos utilizados.

| ACONDICIONAMIENTO | n (%) |
|---|-----------|
| CONVENCIONAL | 100 (100) |
| Ciclofosfamida (120 mg/kg)-ICT (13.5 Gy) | 58 (58) |
| Ciclofosfamida (120 mg/kg)-ICT (13.5 Gy)-Etopósido (10 mg/kg) | 11 (11) |
| Ciclofosfamida (120 mg/kg)-ICT (13.5 Gy)-Tiotepa (10 mg/kg) | 5 (5) |
| Ciclofosfamida (120 mg/kg)-Busulfán (16 mg/kg) | 17 (17) |
| Ciclofosfamida (120 mg/kg)-Busulfán (12 mg/kg)-Tiotepa (10 mg/kg) | 5(5) |
| INTENSIDAD REDUCIDA | 57 |
| Fludarabina (150 mg/m | 16 (28) |
| Fludarabina (150 mg/m | 41 (72) |

La profilaxis farmacológica de la enfermedad injerto contra receptor (EICR) se basó en ambos grupos en ciclosporina, en la mayor parte de los casos acompañada por un ciclo corto de metotrexate a dosis de 10 mg/kg los días +1, +3 y +6 del trasplante, seguido de un tratamiento corto con ácido fólico a dosis de 10 mg/6 horas por 4 dosis el día +2 y 6 dosis los días +4 y +7. En el grupo de acondicionamiento convencional un 28% recibió solamente ciclosporina y un 8% recibió prednisona en lugar de metotrexate. En ambos grupos se mantuvo la profilaxis con ciclosporina hasta el día +90 y en ese momento si no se había producido EICR se inició un descenso paulatino de la ciclosporina. Para determinar el grado de afectación de la EICR se usaron los criterios habituales (*Prezpiorka D et al, 1995*). El tratamiento de la EICR se realizó con prednisona en dosis de 2 mg/kg/día y los casos refractarios se trataron de forma variada dependiendo del momento, pero en general con ATG o con un anticuerpo monoclonal anti interleucina-2.

La profilaxis anti-bacteriana se realizó con norfloxacino o ciprofloxacino durante la neutropenia y se mantuvo durante todo el periodo o hasta el inicio de un tratamiento de amplio espectro con cefepime o carbapenem, si el paciente presentaba fiebre. Como antifúngico se utilizó fluconazol hasta el inicio de

Objetivo 1: Trasplante convencional vs Alo-TIR.

tratamiento con actividad frente a *Aspergillus spp.* cuando fue necesario. Se administró profilaxis con aciclovir durante el periodo de hospitalización y se determinó la reactivación de CMV mediante antigenemia durante el ingreso, con una frecuencia bisemanal.

Estudio estadístico

La probabilidad de supervivencia global (SG) se estimó mediante el test de Kaplan-Meier desde el momento del trasplante hasta el momento de la muerte por cualquier causa y los pacientes vivos se censuraron en el último seguimiento. La probabilidad de MRT se calculó mediante incidencia acumulada, considerando la recidiva de la enfermedad de base como un evento competitivo, de forma que los pacientes que fallecieron sin haberse producido la recidiva se consideraron como muertes atribuibles al trasplante, mientras que los pacientes que progresaron se censuraron en ese momento; los pacientes vivos y sin recidiva se censuraron en el último seguimiento. Para el cálculo de EICR se incluyeron todos los pacientes que estaban vivos en el día +16 para la forma aguda y en el día +100 para la forma crónica. El injerto de neutrófilos se consideró el primero de tres días consecutivos con al menos $0.5 \times 10^9/L$ neutrófilos y el de plaquetas el primero de tres días con recuento de plaquetas de al menos $50 \times 10^9/L$ si transfusiones.

Se realizaron análisis univariados de diversas variables clínicas en relación con SG y MRT mediante el test de Cox univariado. Aquellas variables que resultaron estadísticamente significativas o con una tendencia a la significación ($P < 0.1$) se incluyeron en un análisis multivariado mediante el test de regresión de Cox para riesgos proporcionales.

Resultados

Recuperación hematopoyética

El tiempo hasta el injerto granulocitario fue de 14 días (rango 9-33 días) en el grupo de Alo-CONV y de 15 días (rango 11-26 días) en grupo Alo-TIR (P: no significativa). El tiempo hasta la recuperación plaquetar fue de 17 días (rango 7-110 días) en el grupo de Alo-CONV y de 14 días (rango 10-377 días) en grupo Alo-TIR (P: no significativa). Un paciente en el grupo de Alo-CONV que había recibido un

Objetivo 1: Trasplante convencional vs Alo-TIR.

trasplante con un producto de aféresis y selección positiva de progenitores CD34+ presentó un fallo de injerto primario y falleció por una neumonía viral tras un segundo trasplante.

Enfermedad injerto contra receptor

Cuatro pacientes (dos en cada grupo) que fallecieron antes del injerto hematopoyético se excluyeron del análisis de EICR. Las causas de las muerte fueron: síndrome de obstrucción sinusoidal (día +8), neumonía intersticial (día +10), toxicidad neurológica (día +15) e infección no filiada (día +16). En total 153 pacientes fueron valorables para EICR aguda, de los que 93 (66%) presentaron EICR aguda (67% en el grupo Alo-CONV vs 45% en el grupo Alo-TIR). La incidencia acumulada de EICR aguda grado II-IV en el grupo Alo-CONV fue del 46% (Intervalo de confianza del 95% (IC 95%) 38-57%) y en el Alo-TIR fue del 35% (IC 95%: 24-50%), con un riesgo relativo de (RR) de 1.7 (P=0.056). La mediana de aparición de EICR fue en el día +21 (rango 10-82) en el grupo Alo-CONV y en el día +35 (rango 15-95) en el grupo Alo-TIR (P=0.003). En los pacientes del grupo Alo-CONV que recibieron progenitores sin selección positiva de CD34+, la incidencia acumulada de EICR agudo, grado II-IV fue del 50% (IC 95% 38-65%). Ciento dieciséis pacientes (74%) fueron valorables para EICR crónica (74% en cada uno de los dos grupos). En el grupo Alo-CONV desarrollaron EICR el 57% de los pacientes y fue extensa en el 27%, mientras que en el grupo Alo-TIR se objetivó EICR crónica en el 66% de los pacientes y fue extensa en un 21%. La incidencia acumulada de EICR crónica a los 2 años fue del 62% (IC 95%: 54-72%) para la serie global, 59% (CI 95%: 49-72%) en el grupo Alo-CONV y 68% (CI 95%: 55-84%) en el Alo-TIR (P= No significativa). La incidencia acumulada de EICR crónica extensa a los 2 años fue del 26% (IC 95% 19-36%) para la serie global, 28% (CI 95% 19-40%) en el grupo Alo-CONV y 23% (CI 95%: 13-41%) en el Alo-TIR (P= No significativa).

Mortalidad relacionada con el trasplante

Un total de 45 pacientes fallecieron por causas atribuibles al trasplante (MRT), 33 de los 100 (33%) del grupo Alo-CONV y 12 de los 57 (21%) en el grupo Alo-TIR; la incidencia acumulada de MRT a los dos años en la población global fue del 27% (IC 95%: 22-41), 30% (95% IC:22-41%) en el grupo Alo-CONV y 22% (IC 95%: 13-37%) en el grupo Alo-TIR (P= no significativa entre Alo-CONV y Alo-TIR). La

tabla 9 detalla las causas de muerte, entre las que las más frecuentes fueron la EICR y las infecciones.

Tabla 10: Causas de muerte asociadas al trasplante

| | CONVENCIONAL (N=100) | INTENSIDAD REDUCIDA (N=57) |
|--------------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| EICR aguda | 8 (8) | 5 (9) |
| EICR crónica | 3 (3) | 2 (3) |
| Infecciones | 13 (13) | 3 (5) |
| Bacterianas | 2 (2) | 1 (2) |
| Víricas | 5 (5) | - |
| Toxoplasma | 1 (1) | - |
| No filiadas | 5 (5) | 2 (3) |
| Síndrome neumonitis idiopática | 3 (3) | - |
| Otras | 6 (6) | 2 (3) |
| Total | 33 (33) | 12 (21) |

EICR: Enfermedad injerto contra receptor. N: Número.

Las muertes atribuibles a MRT se produjeron en el día +82 de mediana pero con un gran rango que osciló entre los días +8 y +1447. En la **tabla 10** se detallan los factores que se relacionaron con un mayor riesgo de MRT, tanto en el análisis univariado como en el multivariado y los que permanecieron como estadísticamente significativos en este último fueron los siguientes: Acondicionamiento convencional (RR 5.4, IC 95% 2.3-12.8; P<0.001), edad mayor de 45 años (RR 5 IC 95% 2.4-10.8; P<0.001), haber recibido un trasplante previo (RR 2.8, IC 95% 1.3-6.3; P<0.001) y no haber recibido un trasplante con selección positiva de células CD34 (RR 2.8, IC 95% 1.3-5.8; P<0.001).

Tabla 11: Análisis de los factores relacionados con la muerte atribuible al trasplante

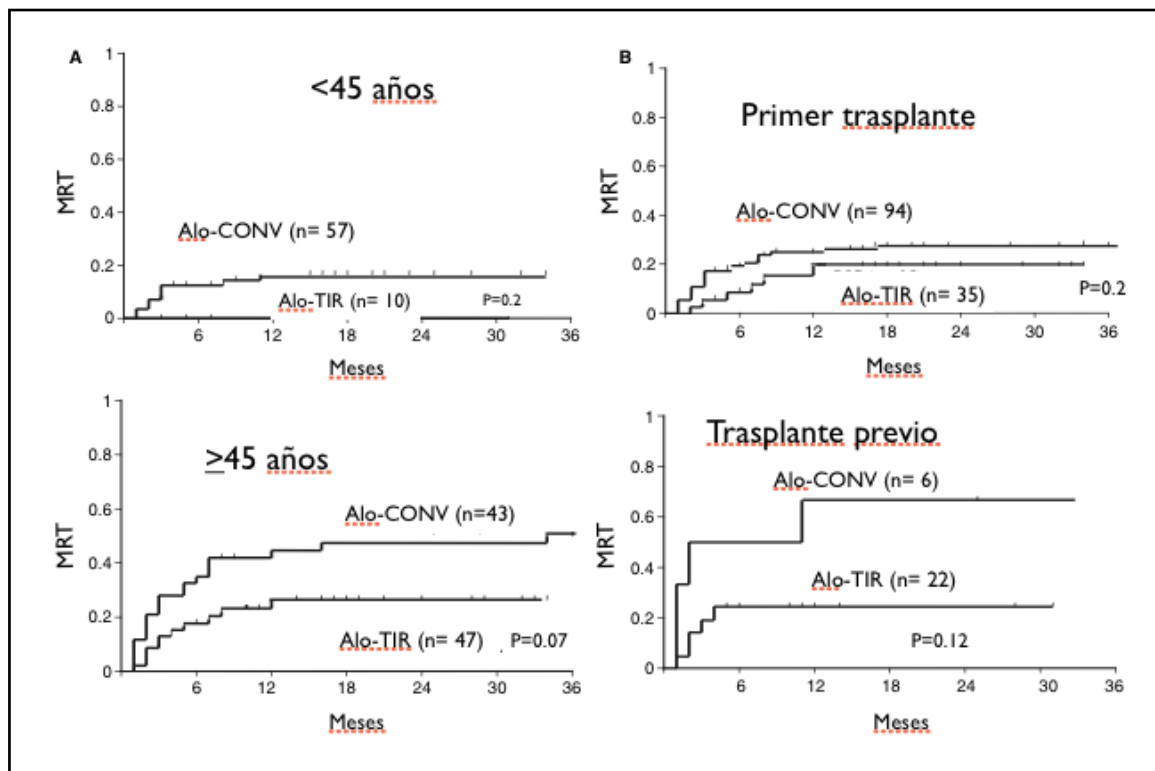
| VARIABLES INTRODUCIDAS (SIGNIFICATIVAS EN EL ANÁLISIS UNIVARIADO) | FACTOR DE RIESGO | RR (95% IC) | P |
|---|-----------------------------------|----------------|--------|
| Tipo de acondicionamiento | CONV vs. TIR | 5.4 (2.3-12.8) | <0.001 |
| Edad (años) | ≥ 45 vs. <45 | 5 (2.4-10.8) | <0.001 |
| Trasplante previo | Si vs. NO | 2.8 (1.3-6.3) | <0.001 |
| Manipulación ex-vivo | No selección vs Selección CD 34+ | 2.8 (1.3-5.8) | 9 |
| Tipo de enfermedad | LMC vs. Otras | | NS |
| Fuente de progenitores | Médula ósea vs. sangre periférica | | NS |
| Fase de la enfermedad | No precoz vs. Precoz | | NS |

CONV: Grupo de acondicionamiento convencional, TIR: Trasplante de intensidad reducida, LMC: Leucemia mieloide crónica, NS: No significativo.

La **figura 3** muestra las curvas de incidencia acumulada de MRT en los grupos Alo-CONV y Alo-TIR con los pacientes estratificados por edad y por número de trasplante. La MRT entre los pacientes de más de 45 años fue mayor en los del grupo Alo-CONV (47%, IC 95%: 34-65%) que en el grupo Alo-TIR (27%, 95% IC: 16-44%) aunque el riesgo relativo (1.95; IC 95%: 0.94-3.93; P=0.07) no alcanzó significación estadística. Entre los pacientes menores de 45 años, la incidencia acumulada de MRT en el grupo Alo-CONV fue del 17% (IC 95%: 9-30%) y en el grupo Alo-TIR del 0% (P=no significativa). Entre los pacientes que habían recibido previamente un trasplante, la MRT en el grupo Alo-CONV fue superior (67%, IC 95%: 38-100%) que la observada en el grupo Alo-TIR (24%, IC 95%: 11-53%), pero nuevamente la diferencia no resultó ser estadísticamente significativa (RR 2.7; IC 95% 0.7-9.5, P=0.135).

No se objetivó ninguna muerte en pacientes con serología para CMV negativa y donante también seronegativo (pacientes CMV -/-) y aunque este factor no resultó significativo en análisis multivariado es posible que esto sea debido al escaso número de pacientes CMV -/- entre nuestra población.

Figura 3: Mortalidad relacionada con el trasplante.



Progresión de la enfermedad de base

La incidencia acumulada a los 2 años de progresión de la enfermedad o recidiva en la serie global fue de 25% (IC 95%: 18-34%), sin diferencias entre el grupo Alo-CONV con un valor del 24% (IC 95%: 17-35) y el grupo Alo-TIR con un valor también del 24% (IC 95%: 14-41%). La recidiva o progresión de la enfermedad de base fue la causa de muerte en 20 (20%) pacientes en el grupo Alo-CONV y en 7 (13%) pacientes en el grupo Alo-TIR.

Supervivencia global

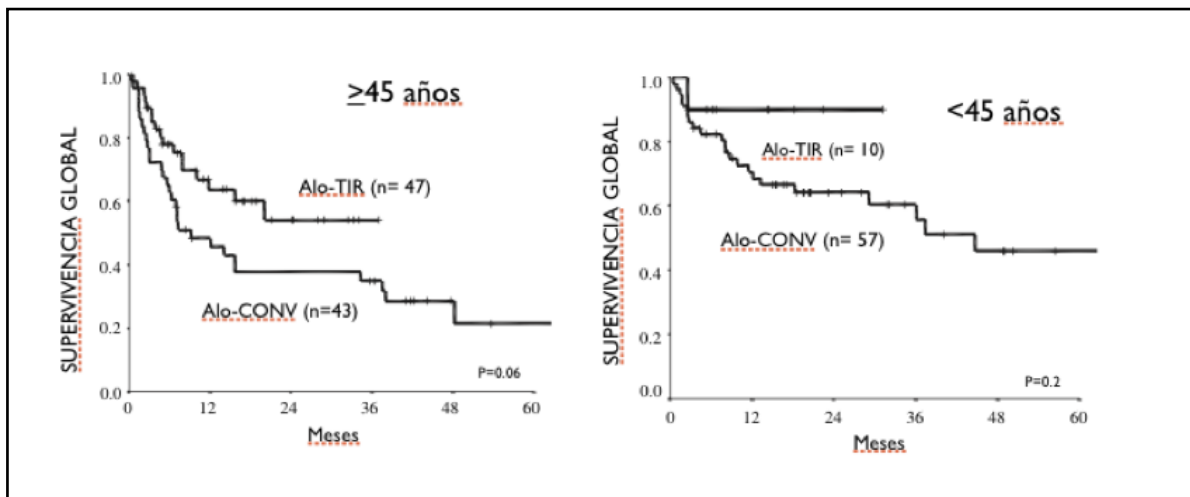
La SG a los 2 años para la serie completa fue del 55% (IC 95%: 46.6- 63.8), en el grupo Alo-CONV fue de 52.5% (IC 95%: 42.1-62.9) y en el grupo Alo-TIR fue de 59% (IC 95%: 39.2-75.8). En la **tabla 11** se detallan los factores que se relacionaron con una menor SG en el análisis univariado y multivariado. En este último, los factores que mantuvieron significación estadística fueron: Acondicionamiento convencional (RR 2.4; IC 95% 1.3-3.4, P=0.004) y edad \geq 45 años (RR 2.1; IC 95% 2.1-3.6, P=0.004).

Tabla 12: Análisis de los factores relacionados con la supervivencia global.

| VARIABLES INTRODUCIDAS (SIGNIFICATIVAS EN EL ANÁLISIS UNIVARIADO) | FACTOR DE RIESGO | RR (95% IC) | P |
|---|-----------------------------------|----------------|--------|
| Tipo de acondicionamiento | CONV vs. TIR | 5.4 (2.3-12.8) | <0.001 |
| Edad (años) | ≥ 45 vs. <45 | 5 (2.4-10.8) | <0.001 |
| Tipo de enfermedad | LMC vs. Otras | 2.3 (1-5.2) | 0.05 |
| Fase de la enfermedad | No precoz vs. Precoz | 1.7 (0.9-3) | 0.07 |
| Manipulación ex-vivo | No selección vs Selección CD 34+ | | NS |
| Trasplante previo | Si vs. NO | | NS |
| Fuente de progenitores | Médula ósea vs. sangre periférica | | NS |

En la **figura 4** se muestran las curvas de supervivencia global en los grupos Alo-CONV y Alo-TIR con los pacientes estratificados según la edad. En el subgrupo de pacientes de edad ≥ 45 años la supervivencia del grupo Alo-CONV fue ligeramente inferior 37% (IC 95% 22- 42%) que en el grupo Alo-TIR 54% (IC 95%: 26-72%) con una P que rozó la significación estadística (P=0.06), mientras que el grupo de pacientes menores de 45 años, las diferencias fueron mucho menos acusadas.

Figura 4: Supervivencia Global.



Objetivo 1: Trasplante convencional vs Alo-TIR.

Los resultados de esta parte del trabajo fueron publicados en forma de artículo en el European Journal of Hematology y a continuación se aporta una copia del trabajo tal y como se publicó.

Artículo 1: Conventional versus reduced-intensity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies

Eur J Haematol 2005; 74: 144–151
All rights reserved

Copyright © Blackwell Munksgaard 2005
EUROPEAN
JOURNAL OF HAEMATOLOGY

Conventional versus reduced-intensity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies

Valcárcel D, Martino R, Sureda A, Canals C, Altés A, Briones J, Sanz MA, Parody R, Constans M, Vilella SL, Brunet S, Sierra J.
Conventional versus reduced-intensity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies.
Eur J Haematol 2005; 74: 144–151. © Blackwell Munksgaard 2005.

D. Valcárcel, R. Martino, A. Sureda, C. Canals, A. Altés, J. Briones, M. A. Sanz, R. Parody, M. Constans, S. L. Vilella, S. Brunet, J. Sierra

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract: *Background:* Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) from human leukocyte antigen (HLA)-compatible sibling donors is a potential curative treatment for hematological and non-hematological malignancies. Nevertheless, high mortality rates may be associated with this therapy, especially in older patients, those with other comorbidities or who receive a second HSCT. *Patients and methods:* We analyzed the factors associated with transplant-related mortality (TRM) and overall survival in 157 consecutive adult patients (104 males and 53 females) who received a HSCT [29 bone marrow (BM) transplantation and 128 peripheral blood (PB) transplantation] from a HLA-identical sibling between January 1995 and March 2002 in our institution. One hundred patients received a standard conditioning prior to HSCT (STAND) and 57 patients received a reduced-intensity conditioning (RIC) HSCT. Fifty-eight patients were in an early phase at transplant and 99 in a non-early phase. Median age was 46 yr (16–66), and 90 patients (57%) were >45 yr of age. *Results:* Patients in the RIC group were older than those in the STAND group, and had a higher proportion of non-early disease phases including a prior autologous HSCT in 39%. Median follow-up for survivors was 28 and 15 months in the STAND and RIC groups ($P < 0.001$), respectively. Cumulative incidence of TRM at 2 yr was 30% [95% confidence interval (CI) 22–41%] for the STAND group and 22% (95% CI 13–37%) for the RIC group [non-significant (NS)]. Factors associated with a higher TRM in multivariate analysis were: STAND vs. RIC conditioning regimen [relative risk (RR) 5.4; 95% CI 2.3–12.8; $P < 0.001$]; age ≥ 45 yr vs. < 45 yr (RR 5; 95% CI 2.4–10.8, $P < 0.001$); second vs. first HSCT (RR 2.8, 95% CI 1.3–6.3, $P = 0.01$) and non-T-cell-depleted vs. T-cell-depleted graft (RR 2.7, 95% CI 1.3–5.8, $P = 0.009$). Overall survival (OS) at 2 yr was $52.5 \pm 10.4\%$ for STAND group and $59 \pm 16.8\%$ in RIC group. Factors associated with poorer OS in multivariate analysis were: STAND vs. RIC conditioning regimen (RR 3.4, 95% CI 1.7–6.9, $P = 0.001$); age ≥ 45 vs. < 45 yr (RR 2.5, 95% CI 1.4–4.5, $P = 0.002$) and diagnosis [other than chronic myeloid leukemia (CML) vs. CML] (RR 2.6, 95% CI 1.2–5.7 $P = 0.02$). *Conclusions:* Our results indicate that the introduction of RIC allogeneic HSCT for patients at high risk for TRM (advanced age, prior HSCT and non-T-cell depletion) leads to a reduction in the TRM and improvement in the OS.

Key words: allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; reduced-intensity conditioning regimens; therapy-related mortality

Correspondence: Rodrigo Martino, Servei d'Hematologia Clínica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Av. Sant Antoni M O Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain
Tel: 34-932919396
Fax: 34-932919466
e-mail: rmartino@hsp.santpau.es

Accepted for publication 9 September 2004

Artículo 1: Conventional versus reduced-intensity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a potential curative treatment for hematological and non-hematological malignancies but it may be associated with high rates of transplant-related mortality (TRM), especially in older patients or those who have undergone a previous HSCT. TRM is mainly related to toxicity, infections and graft-vs.-host disease (GVHD). In recent years, reduced-intensity conditioning (RIC) regimens are being increasingly used with the aim of reducing TRM, because of their lower toxicity (1–9), with apparent reduction of the early TRM (8, 10–13). However, to our knowledge, only few (10, 11) studies have shown a true reduction in the TRM when compared with standard myeloablative conditioning regimens. In this study, we determined the factors associated with TRM and overall survival (OS) in adult recipients of a human leukocyte antigen (HLA)-identical allogeneic HSCT in our institution, and to determine the impact of our RIC regimen on the outcome of these patients.

Patients and methods

Patients

We included 157 (104 males, 53 females) consecutive adult patients who received a HSCT from a HLA-identical sibling donor at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau between January 1995 and March 2002. Since January 1999, RIC regimens were being used in patients > 45 yr of age and/or who had undergone a prior autologous HSCT. These patients gave their written informed consent for inclusion in a multicentric prospective trial which was approved by the Spanish Health Ministry and our ethical committee (7). Follow-up in survivors was 28 months (range 3–94 months) in the STAND group and 15 months (range 3–37 months) in the RIC group ($P < 0.001$).

Standard conventional myeloablative conditioning regimens (STAND) were used in 100 patients and RIC in 57 patients. Main patient characteristics are summarized in Table 1. The median age for the entire cohort was 46 yr (range 16–66), which was higher in the RIC group than in the STAND group (51 yr vs. 39 yr; $P < 0.001$). Disease status was defined as early phase [acute leukemia or poor-risk myelodysplasia in first complete remission, untreated good-risk myelodysplasia, first chronic phase of chronic myeloid leukemia (CML) and lymphoid malignancy in first remission] in 50 patients (50%) in the STAND group and in eight patients (14%) in the RIC group ($P < 0.001$). The source of stem cells was peripheral blood in 72 patients (72%) in the STAND group and in all

Conventional vs. reduced-intensity conditioning

Table 1. Patient characteristics

| | STAND group (n = 100) | RIC group (n = 57) | P-value |
|--|--------------------------|-----------------------|---------|
| Age [median (range)] | 39 (16–63) | 51 (24–66) | <0.001 |
| Age | | | |
| <45 yr [n (%)] | 57 (57) | 10 (17.5) | <0.001 |
| ≥45 yr [n (%)] | 43 (43) | 47 (82.5) | |
| Sex [male/female; n (%)] | 68 (68)/32 (32) | 36(63)/21 (37) | NS |
| Female to male [n (%)] | 26 (26) | 15 (26) | NS |
| Diagnoses [n (%)] | | | |
| AML/MDS | 29 (29)/12 (12) | 4(7)/7 (12) | |
| ALL | 16 (16) | 2 (3) | |
| CML/MF | 23 (23) | 4 (7)/1 (2) | |
| NHL/CLL | 11 (11)/1 (1) | 16 (28)/5 (9) | |
| MM | 8 (8) | 13 (23) | |
| HL | | 5 (9) | |
| Disease phase; early/non-early (%) | 50 (50)/50 (50) | 8 (14)/49 (86) | <0.001 |
| Source of progenitors; PB/BM (%) | 72 (72)/28 (28) | 56 (98)/1 (2) | <0.001 |
| T-cell-depleted graft (%) | 55 (55)/45 (45) | 0 | <0.001 |
| Number of HSCT; first/more than one (%) | 94 (94)/6 (6) | 35 (61)/22 (39) | <0.001 |
| Donor/recipient CMV-negative (%) | 6 (6) | 6 (10.5) | NS |
| Follow-up for survivors (months) | 28 (3–94) | 14.5 (3–37) | <0.001 |

AML, acute myeloid leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome; ALL, acute lymphoblastic leukemia; CML, chronic myeloid leukemia; MF, idiopathic myelofibrosis; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; CLL, chronic lymphocytic leukemia; MM, multiple myeloma; HL, Hodgkin's lymphoma.

except one patient in the RIC group ($P < 0.001$). *Ex vivo* manipulation of stem cell was performed in 45 patients in the STAND group and in none in the RIC group. A previous HSCT had been performed in six patients (6%) in the STAND group and 22 (39%) in the RIC group ($P < 0.001$).

Conditioning regimens

Conditioning regimens are detailed in Table 2. Two different conditioning regimens were used in the RIC group, one for myeloid malignancies and the other for lymphoid malignancies. The myeloid RIC regimen consisted of fludarabine plus busulphan

Table 2. Conditioning regimens used in HSCT

| Conditioning regimen | n (%) |
|---|---------|
| STAND group | 100 |
| Cy (120 mg/kg/d)–TBI (13.5 Gy) | 58 (58) |
| Cy (120 mg/kg)–etoposide (10 mg/kg)–TBI (13.5 Gy) | 11 (11) |
| Cy (100 mg/kg)–thiotepa (5 mg/kg/d –8 and –7)–TBI (13.5 Gy) | 5 (5) |
| Cy (120 mg/kg/d)–busulphan (16 mg/kg) | 17 (17) |
| Cy (100 mg/kg)–busulphan (12 mg/kg)–Thiotepa (10 mg/kg) | 5 (5) |
| RIC group | 57 |
| Fludarabine (150 mg/m ² /d)–melphalan (140 mg/m ²) | 41 (72) |
| Fludarabine (150 mg/m ² /d)–busulphan (10 mg/kg) | 16 (28) |

Cy, cyclophosphamide; TBI, total body irradiation.

Artículo 1: Conventional versus reduced-intensity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies

Valcárcel *et al.*

and the lymphoid RIC regimen consisted of fludarabine plus melphalan. In the STAND group, most patients (96%) received high doses of cyclophosphamide. Seventy-four of them (74%) received total body irradiation with high doses of cyclophosphamide (11 with etoposide and five with thiotepea), and 17 (17%) patients received busulphan with cyclophosphamide.

Graft-vs.-host disease prophylaxis and supportive care

Graft-vs.-host disease (GVHD) prophylaxis in the RIC group consisted of cyclosporine A (CsA) and a short course of methotrexate (MTX) therapy, followed by folinic acid rescue, as described elsewhere (7). Briefly, 10 mg/m² of MTX was given on day +1 (24 h after stem cell infusion), +3 and +6 followed by 10 mg folinic acid every 6 h for four doses after the start of each dose of MTX (24 h after MTX). In the STAND group, 64% of the patients received CsA and a short course of MTX followed by folinic acid rescue, while recipients of CD34+ -selected grafts received CsA alone (28%) or CsA and prednisone (8%). Prophylaxis was maintained in both groups until day +90 in those patients without acute GVHD, disease progression or graft failure. Acute and chronic GVHD were graded by established criteria (13, 14). Grade II or greater acute GVHD was treated with prednisone or an equivalent at 2 mg/kg/d, with subsequent tapering in responsive cases. Refractory cases were treated with antilymphocyte globulin, anti-interleukin (IL) 2 or other salvage regimens.

Infection prophylaxis consisted of norfloxacin or ciprofloxacin treatment during the neutropenic period or until the start of cefepime or imipenem for neutropenic fever and fluconazole until hospital discharge or until the start of amphotericin for persistent fever. Fluconazole was also used whenever steroids were used. Aciclovir was administered until hospital discharge. Cytomegalovirus (CMV) antigenemia was monitored twice weekly until hospital discharge and at least once weekly until day +100, and after that as clinically indicated.

Statistical analysis

The probability of OS was estimated from the time of transplantation using the Kaplan–Meier product-limit estimate, while the probability of TRM was calculated using cumulative incidence estimates. For the endpoint of TRM, disease progression was regarded as a competing risk. Patients who died without disease progression were categorized as TRM, while patients alive without progression were censored at last follow-up and

those who suffered disease progression were censored at progression. OS was calculated from transplant until death from any cause, and surviving patients were censored at last follow-up. The cumulative incidence and time to onset of acute GVHD and chronic GVHD were calculated in all patients who survived for at least 16 and 100 d after transplant, respectively. Granulocyte engraftment was defined as the first day when the granulocytes reached counts of $>0.5 \times 10^9/L$ and platelet engraftment was defined as the first day when the platelets reached counts of $>50 \times 10^9/L$ without transfusion.

Univariate analyses of the association of various clinical risk factors with the hazard of failure from TRM and OS were performed using univariate Cox regression models. Multivariate analyses were performed with Cox proportional hazards regression, with inclusion of variables with a *P*-value <0.1 in the prior univariate testing. The assumption of proportional hazards over time was tested for all explanatory covariates using a time-dependent covariate. Two-sided *P*-values resulting from the regression models were derived using the Wald test, and no adjustments were made for multiple comparisons.

Results

Hematological recovery

Time to granulocyte engraftment was 14 d (range 9–33 d) in the STAND group and 15 d (range 11–26 d) in the RIC group (*P*-value NS). Time to platelet engraftment was 17 d (range 7–110 d) in the STAND group and 14 d (range 10–377 d) in the RIC group (*P*-value NS). One patient who had been transplanted with a CD34+ -selected graft in the STAND group developed graft failure and died of viral pneumonia after a second HSCT.

Graft-vs.-host disease

Four patients (two in each group) died before engraftment, on days 8, 10, 15 and 16 after HSCT because of hepatic veno-occlusive disease, interstitial pneumonia, neurologic toxicity and an unknown infection, respectively. Acute GVHD was evaluable in 153 patients. Ninety-three patients (61%) developed acute GVHD, 66 patients (67%) in the STAND group and 25 (45%) in the RIC group. Sixty-five patients (41%) developed grade II–IV acute GVHD, 46 (47%) in the STAND group and 19 (35%) in the RIC group. The cumulative incidence of grade II–IV acute GVHD at 100 d in STAND and RIC group were 46% (95% CI 38–57%) and 35% (95% CI 24–50%),

Artículo 1: Conventional versus reduced-intensity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies

Conventional vs. reduced-intensity conditioning

respectively [relative risk (RR) 1.7; $P = 0.056$]. The median day of onset of acute GVHD was +21 (range 10–82) in the STAND group and +35 (range 15–95) in the RIC group ($P = 0.003$). The cumulative incidence of grade II–IV acute GVHD in recipients of a non-CD34+ -selected graft was 50% (95% CI 38–65%) in the STAND group.

One hundred and sixteen patients were evaluable for chronic GVHD, 74 (74%) in the STAND group and 42 (74%) in the RIC group. Forty-two (57%) evaluable patients in the STAND group developed chronic GVHD, and in 20 (27%) of these patients it was extensive. In the RIC group, 28 (66%) evaluable patients developed chronic GVHD, which was extensive in nine (21%) patients. The cumulative incidence at 2 yr of chronic GVHD was 62% (95% CI 54–72%) for the entire cohort. The cumulative incidence of chronic GVHD at 2 yr for the STAND and RIC group were 59% (95% CI 49–72%) and 68% (95% CI 55–84), respectively (P -value NS). The cumulative incidence of chronic extensive GVHD for the entire cohort was 26% (95% CI 19–36%), and for the STAND and RIC groups it was 28% (95% CI 19–40%) and 23% (95% CI 13–41), respectively, (P -value NS). In recipients of non-CD34+ -selected grafts in STAND group, the cumulative incidence of chronic extensive GVHD was 37% (95% CI 24–56%).

Transplant-related mortality

Thirty-three (33%) of the 100 patients included in the STAND group died of TRM during the follow-up period, when compared with 12 of 57 (21%) in the RIC group. The cumulative incidence of TRM at 2 yr for the entire group was 27% (95% CI 21–36%). In the STAND group, the cumulative incidence of TRM at 2 yr was 30% (95% CI 22–41%) and in the RIC group it was 22% (95% CI 13–37%) (NS). The main causes of TRM were infections and GVHD (Table 3). TRM occurred at a median day +82 (10–1447) in the STAND group and at day +99 (8–352) in the RIC group (NS) (Table 3). The factors associated with higher TRM at 2 yr in univariate analysis were: age ≥ 45 yr vs. < 45 yr (41% vs. 17%, respectively; $P = 0.0045$) and CMV donor/receptor other than negative/negative vs. negative/negative (33% vs. 0%; $P = 0.04$). Sex, diagnosis, phase at transplant, source of stem cells, type of conditioning regimen, number of stem cells, number of HSCT, T-cell depletion and ABO incompatibility were not found to be statistically significant in the univariate analysis. In the multivariate analysis, we included the conditioning regimen (STAND vs. RIC), age (≥ 45 yr vs. < 45 yr), number of HSCT (more than one vs. first), *ex vivo* manipulation (CD34+ -selected

Table 3. Causes of TRM in both groups of patients

| Cause | STAND (n = 100) | RIC (n = 57) |
|--|-----------------|--------------|
| Acute GVHD | 8 (8) | 5 (9) |
| Chronic GVHD with or without infection | 3 (3) | 2 (3) |
| Infections | 13 (13) | 3 (5) |
| Bacterial | 2 (2) | 1 (2) |
| Viral | 5 (5) | – |
| <i>Toxoplasma</i> | 1 (1) | – |
| Unknown | 5 (5) | 2 (3) |
| Idiopathic pneumonia Sdr. | 3 (3) | – |
| Other | 6 (6) | 2 (3) |
| Total | 33 (33) | 12 (21) |
| Onset, median day (range) | +82 (10–1447) | +99 (8–352) |
| <day +30 | 3 (10) | 2 (16) |
| Day +31 to +100 | 16 (48) | 5 (42) |
| >day +100 | 14 (42) | 5 (42) |

Values are given as n (%).

vs. non-CD34+ -selected), phase at transplant (non-early vs. early), diagnosis (non-CML vs. CML), CMV status, and the source of stem cells (PB vs. BM). Results are shown in Table 4. The most important factor associated with TRM was STAND conditioning regimen (RR 5.4; 95% CI 2.3–12.8; $P < 0.001$), and the second most important factor was age ≥ 45 yr (RR 5; 95% CI 2.4–10.8; $P < 0.001$). Other factors associated with higher TRM were having received a previous HSCT (RR 2.8; 95% CI 1.3–6.3; $P = 0.01$) and a non-T-cell-depleted graft (RR 2.7; 95% CI 1.3–5.8; $P = 0.009$).

Figure 1 shows the cumulative incidence of TRM by conditioning regimen with patients stratified by age and by the number of HSCT. Among those patients older than 45 yr (Fig. 1A), the cumulative incidence of TRM was higher in patients in the STAND group (47%; 95% CI 34–65%) than in the RIC group (27%; 95% CI 16–44%), although this difference was not statistically significant (RR 1.95; 95% CI 0.94–3.93, $P = 0.07$). Among patients < 45 yr of age (Fig. 1A), the cumulative incidence of TRM in the STAND group was 17% (95% CI 9–30%) and for the RIC group it was 0% (NS). In the subgroup of patients with a previous HSCT, cumulative incidence of TRM at 2 yr in the STAND and RIC group were 67% (95% CI 38–100%) and 24% (95% CI 11–53%), respectively

Table 4. Multivariate analysis of TRM

| Covariate | Risk Factor | RR (95% CI) | P |
|-----------------------|-----------------------|----------------|-----------|
| Conditioning regimen | STAND vs RIC | 5.4 (2.3–12.8) | < 0.001 |
| Age | ≥ 45 vs < 45 | 5 (2.4–10.8) | < 0.001 |
| HSCT number | > 1 vs 1 | 2.8 (1.3–6.3) | < 0.01 |
| Ex-vivo manipulation | Non T-cell depleted | 2.8 (1.3–5.8) | 0.009 |
| Disease | Other than CML vs CML | | NS |
| Source of progenitors | BM vs PB | | NS |
| Phase | Non early vs early | | NS |

Artículo 1: Conventional versus reduced-intensity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies

Valcárcel *et al.*

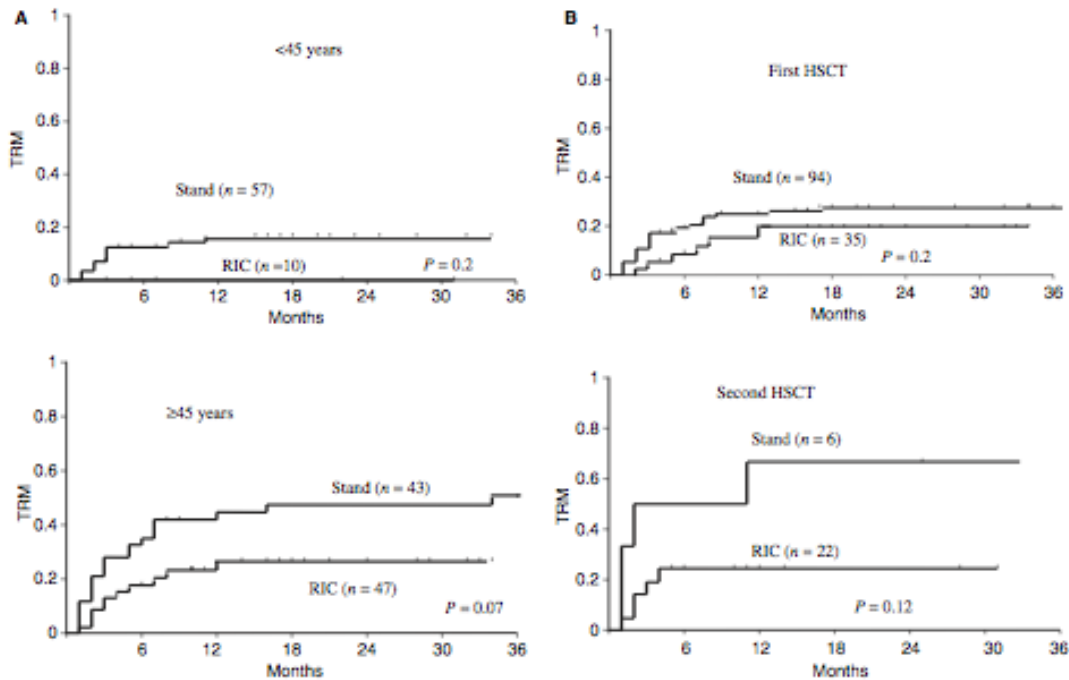


Fig. 1. Transplant-related mortality in both groups of patients (STAND vs. RIC). (A) Patients stratified by age and (B) patients stratified by number of transplant.

(RR 2.7; 95% CI 0.7–9.6, $P = 0.135$) (Fig. 1B). In the subgroup of patients who had not undergone a previous HSCT, the cumulative incidence of TRM in the STAND and RIC group were 27% (95% CI 20–38%) and 20% (95% CI 9–40%), respectively (RR 1.7; 95% CI 0.7–4.2, $P = 0.2$) (Fig. 1B). Although no death occurred in CMV-seronegative patients with a CMV negative donor (–/– CMV patients), there was no statistical significance of CMV status in multivariate analysis, but this was possibly related to the low frequency of –/– CMV patients in our study.

Disease progression

Cumulative incidence of disease progression or relapse at 2 yr was 25% (95% CI 18–34%) for the entire cohort, without differences between STAND and RIC groups [24% (95% CI 17–35%) and 24% (95% CI 14–41%), respectively]. Relapse or progression was the cause of death in 20 (20%) patients in the STAND group and in seven (13%) patients in RIC group.

Overall survival

The OS at 2 yr for the entire group was $55.2 \pm 8.6\%$. The OS at 2 yr for the STAND

group was $52.5 \pm 10.4\%$ and $59 \pm 16.8\%$ for the RIC group. In univariate analysis, the factors associated with improved OS were: age (<45 yr vs. ≥45 yr): 67 and 46%, respectively ($P = 0.02$); phase at transplant (early vs. non-early): 69 and 47%, respectively ($P = 0.02$); diagnosis (CML vs. other diagnosis): 85 and 48%, respectively ($P = 0.006$). Other factors (the number of HSCT, conditioning regimen, source of stem cells, year of HSCT, sex, CMV status, ABO incompatibility, *ex vivo* manipulation or use of TBI) did not have any impact on OS. For multivariate analysis, the factors included were conditioning regimen (STAND vs. RIC), age (≥45 yr vs. <45 yr), number of HSCT (more than one vs. first), *ex vivo* manipulation (CD34+ -selected vs. non-CD34+ -selected), phase at transplant (non-early vs. early), diagnosis (non-CML vs. CML), CMV status (–/– vs. others) and the source of stem cells (PB vs. BM). Results are shown in Table 5. The factors associated with a deleterious effect on OS were conditioning regimen (STAND vs. RIC) (RR 2.4; 95% CI 1.3–3.4, $P = 0.004$); age (≥45 yr vs. <45 yr) (RR 2.1; 95% CI 1.3–3.6, $P = 0.007$), diagnosis (other than CML vs. CML), phase at transplant and number of HSCT showed a trend towards lower OS (Table 5). Figure 2 shows the OS in the STAND and RIC groups when stratified by age. In

Artículo 1: Conventional versus reduced-intensity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies

Conventional vs. reduced-intensity conditioning

Table 5. Multivariate analysis of overall survival

| Covariate | Risk Factor | RR (95% CI) | P |
|-----------------------|-----------------------|---------------|-------|
| Conditioning regimen | STAND vs RIC | 2.4 (1.3-4.4) | 0.004 |
| Age | ≥45 vs <45 | 2.1 (1.2-3.6) | 0.007 |
| Disease | Other than CML vs CML | 2.3 (1-5.2) | 0.02 |
| Phase | Non early vs early | 1.7 (0.9-3) | 0.07 |
| HSCT number | >1 vs 1 | 1.9 (0.8-4.5) | 0.1 |
| Source of progenitors | BM vs PB | | NS |
| Ex-vivo manipulation | Non T-cell depleted | | NS |

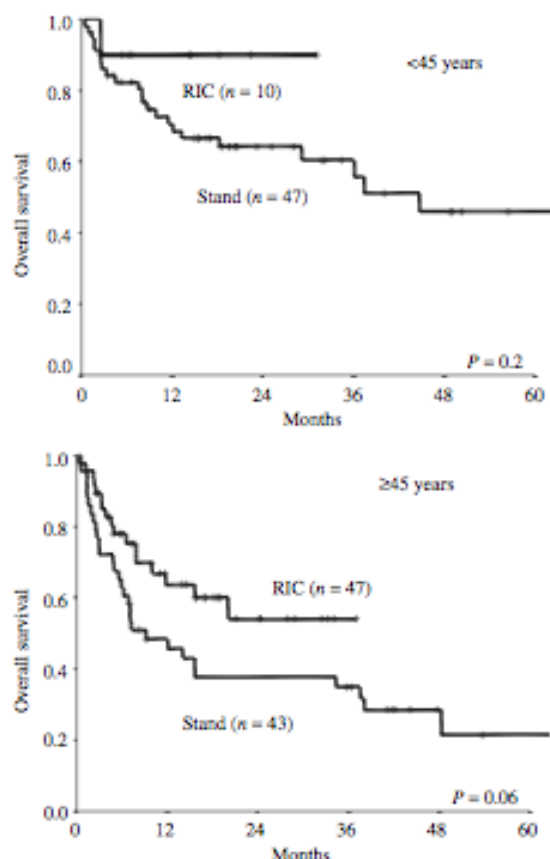


Fig. 2. Overall survival in both groups of patient (STAND vs. RIC), stratified by age (<45 yr vs. ≥45 yr).

the subgroup of patients older than 45 yr, OS at 2 yr in the STAND and RIC group was $37 \pm 15\%$ and $54 \pm 18\%$, respectively ($P = 0.06$). In the subgroup of patients younger than 45 yr, OS at 2 yr in the STAND and RIC group was $64 \pm 13\%$ and $90 \pm 19\%$, respectively ($P = 0.2$) (Fig. 2).

Discussion

Reduced-intensity conditioning regimens for allografting were designed to allow patients who had a very high risk of TRM with conventional

myeloablative conditioning regimens to undergo an allogeneic transplant. In the past, numerous phase II studies with a variety of RIC regimens have shown that stable donor engraftment can be obtained, with an apparent tolerable extrahematologic toxicity from the conditioning regimen itself. Although RIC regimens were introduced to reduce TRM, there are only few studies comparing TRM in RIC and STAND regimens (11, 15, 16) and all show a lower TRM in RIC group. In a recent study Diaconescu *et al.* (10) found non-myeloablative conditioning as the strongest factor predicting reduced TRM and regimen-related toxicities, and our study supports these results. Diaconescu *et al.* (10) found that the reduction of TRM was specially relevant among those patients with poorer pre-transplant characteristics, while we find that the benefit was higher in those patients undergoing their second HSCT.

In this study, several differences were found between both groups. The year of transplantation is different as STAND group patients were included since 1995 and RIC transplants began in our center in 1999. Nevertheless, no significant changes were introduced in standard practice in these years in our center. Other differences, such as disease status, age and prior transplantation also differed between both groups, but all these variables were more unfavorable in RIC group patients.

This study shows that the use of a STAND vs. RIC regimen was the most important factor associated with TRM in a single transplant unit and over a similar time period. Thus, the well-known 'center effect' and 'time effect' in the rate of TRM does not confound the results, as occurs in retrospective multicenter or registry studies. Other classical risk factors such as age, second transplants and diagnosis were also significant in our study. CMV status was not statistically significant, probably because only 12 patients (six in each group) were seronegative for CMV, but it is noteworthy that no CMV seronegative patient with a seronegative donor died. Improvement in the TRM was observed in all the high-risk patient subsets. Although the same variables increased the TRM in recipients of a conventional and a RIC transplant, the former subgroup of patients were more susceptible to these negative variables. Advanced disease at transplantation showed only a tendency towards a higher mortality, possibly if the groups were more homogeneous it will be an important variable in TRM, as in other analyses.

Some authors have warned of the risk of rapid disease progression after minimally intensive RIC regimens. However, the RIC regimens used in this study include some directly cytotoxic chemotherapy, although much less than conventional regimens.

Artículo 1: Conventional versus reduced-intensity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies

Valcárcel *et al.*

This may explain the absence of differences in relapse incidence in the short term, giving time for the establishment of a GVT effect (4, 6, 7, 9). Other authors using similar RIC regimens have also observed prolonged disease-free survival in high-risk patient groups (7, 8, 11). The similar relapse incidence with a reduced TRM led to an improvement in OS in the RIC group. However, several things made a direct comparison in relapse between both regimens impossible as the different diagnostics with more AML/MDS in the STAND group (57% in STAND group vs 22% in RIC group) and the brief follow-up in RIC group (28 months in STAND vs 14 months in RIC group; $P < 0.001$) which may decrease the probability of relapse, and thus, the true impact of RIC regimens on relapse and OS will require future studies focused on specific diseases.

Patients in the RIC group showed a clear tendency to have a lower incidence of acute GVHD than those in STAND group. In previous reports of RIC regimens, the incidence of acute GVHD was quite variable, with studies reporting both low and high incidences. These differences are due to the immunosuppressive regimens used and the inclusion of unrelated and mismatched donors in many reports. The decrease in acute GVHD in RIC regimens is possibly because of a decrease in the release of cytokines and inflammatory mediators, as described elsewhere (17, 18). It is important to note that in the STAND group 45 (45%) patients received a T-cell-depleted graft, which undoubtedly reduces the incidence of acute GVHD (19). In fact, when comparing only non-T-cell-depleted grafts, the incidence of acute GVHD was even higher in the STAND group. The onset of acute GVHD was significantly delayed in the RIC group, as shown by others (12, 20, 21). These differences may be important in reducing the TRM by allowing the separation of the conditioning-related toxicities and GVHD. On the contrary, no differences were found in the incidence of chronic GVHD, which appears to be the main factor related with disease control in RIC allografts (2, 22–24).

In conclusion, our study shows that the introduction of RIC conditioning regimens in our transplant program has led to a reduction of TRM in high-risk patients, with no apparent increase in disease progressions and an improvement in survival. Thus, the initial objective for the introduction of these regimens has been accomplished. Future studies should focus on the refinement of these RIC regimens and their impact in specific diseases.

References

1. CARELLA AM, GIRALT S, SLAVIN S. Low intensity regimens with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as

treatment of hematologic neoplasia. *Haematologica* 2000;**85**:304–313.

2. CHILDS R, CLAVE E, CONTENTIN N, *et al.* Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor t-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood* 1999;**94**:3234–3241.
3. 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.
4. GIRALT S, THALL PF, KHOURI I, *et al.* 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.
5. 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.
6. KOTTARIDIS PD, MILLIGAN DW, CHOPRA R, *et al.* In vivo CAMPATH-1H prevents graft-versus-host disease following nonmyeloablative stem cell transplantation. *Blood* 2000;**96**:2419–2425.
7. MARTINO R, CABALLERO MD, CANALS C, *et al.* Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning: results of a prospective multicentre study. *Br J Haematol* 2001;**115**:653–659.
8. MCSWEENEY PA, NIEDERWIESER D, SHIZURU JA, *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-host-tumor effects. *Blood* 2001;**97**:3390–3400.
9. 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.
10. DIACONESCU R, FLOWERS CR, STORER B, SORROR ML, MARIS MB, MALONEY DG, SANDMAIER BM, STORB R. Morbidity and mortality with nonmyeloablative compared to myeloablative conditioning before hematopoietic cell transplantation from HLA matched related donors. *Blood* 2004;**104**:1550–1558.
11. SORROR ML, MARIS MB, STORER B, SANDMAIER BM, DIACONESCU R, FLOWERS C, MALONEY DG, STORB R. Comparing morbidity and mortality of HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative and myeloablative conditioning: influence of pretransplant comorbidities. *Blood* 2004;**104**:961–968.
12. COURIEL DR, SALIBA RM, GIRALT S, *et al.* Acute and chronic graft-versus-host disease after ablative and nonmyeloablative conditioning for allogeneic hematopoietic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004;**10**:178–185.
13. FERRARA JLM, DEEG HJ. Graft versus host disease. *N Engl J Med* 1991;**324**:667–674.
14. PRZEPIORKA D, WEISDORF D, MARTIN P, KLINGEMANN HG, BEATTY P, HOWS J, THOMAS ED. Consensus Conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant* 1995;**15**:825–830.
15. CANALS C, MARTINO R, SUREDA A, ALTES A, BRIONES J, SUBIRA M, ANCIN I, MARTIN-HENAO G, BRUNET S, SIERRA J. Strategies to reduce transplant-related mortality after allogeneic stem cell transplantation in elderly patients: comparison of reduced-intensity conditioning and unmanipulated peripheral blood stem cells vs a myeloablative

Artículo 1: Conventional versus reduced-intensity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies

regimen and CD34+ cell selection. *Exp Hematol* 2003;**31**:1039–1043.

16. MIELCAREK M, MARTIN PJ, LEISENRING W, FLOWERS ME, MALONEY DG, SANDMAIER BM, MARIS MB, STORB R. Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2003;**102**:756–762.
17. FERRARA JL, LEVY R, CHAO NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999;**5**:347–356.
18. PEREZ-SIMON JA, DIEZ-CAMPELO M, MARTINO R, *et al*. Impact of CD34+ cell dose on the outcome of patients undergoing reduced intensity conditioning allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2003; **102**:1108–1113.
19. HO VT, SOIFFER RJ. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2001;**98**:3192–3204.
20. LEVINE JE, UBERTI JP, AYASH L, REYNOLDS C, FERRARA JL, SILVER SM, BRAUN T, YANIK G, HUTCHINSON R, RATANATHARATHORN V. Lowered-intensity preparative regimen for allogeneic stem cell transplantation delays acute graft-versus-host disease but does not improve outcome for advanced hematologic malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;**9**:189–197.
21. MINEISHI S, KANDA Y, SAITO T, NAKAI K, MAKIMOTO A, KAMI M, TANOSAKI R, WAKASUGI H, TOBINAI K, TAKAUE Y. Impact of graft-versus-host disease in reduced-intensity stem cell transplantation (rist) for patients with hematological malignancies. *Br J Haematol* 2003;**121**:296–303.
22. MATTSOJN J, UZUNEL M, BRUNE M, HENTSCHKE P, BARKHOLT L, STIERNER U, ASCHAN J, RINGDEN O. Mixed chimaerism is common at the time of acute graft-versus-host disease and disease response in patients receiving non-myeloablative conditioning and allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2001;**115**:935–944.
23. NAGLER A, ACKERSTEIN A, KAPELUSHNIK J, OR R, NAPARSTEK E, SLAVIN S. Donor lymphocyte infusion post-non-myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for chronic granulomatous disease. *Bone Marrow Transplant* 1999;**24**:339–342.
24. VALCARCEL D, MARTINO R, CABALLERO D, *et al*. Chimerism analysis following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant* 2003;**31**:387–392.

Conventional vs. reduced-intensity conditioning

Objetivo 2: Estudio de la eficacia del Alo-TIR en LMA y SMD a largo plazo. Efecto de la enfermedad injerto contra huésped crónica en la supervivencia.

Resumen

Este trabajo se realizó con la intención de estudiar el resultado a largo plazo del trasplante con acondicionamiento de intensidad reducida (Alo-TIR) en pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) y síndrome mielodisplásico (SMD) de alto riesgo, e investigar los factores relacionados con los resultados.

Se incluyeron 93 pacientes de diversos centros (59 LMA y 34 SMD), con una edad mediana de 53 años y un seguimiento mediano de 43 meses.

La mortalidad asociada al procedimiento a los 3, 12 y 48 meses fue del 8%, 16% y 21%, respectivamente. La incidencia de recidiva a 1 y 4 años fue de 23% y 37%, respectivamente, y supuso la principal causa de muerte en la serie. A los 4 años, la supervivencia global fue del 45% y la libre de evento del 43%. La incidencia acumulada de enfermedad injerto contra receptor crónica fue del 53% y su presencia resultó ser el factor más importante en términos de reducción de recidiva y de mejora de la supervivencia global y libre de evento. La realización del trasplante a pacientes en fases avanzadas de la enfermedad se asoció a una mayor incidencia de recidiva y peor supervivencia libre de evento.

Nuestro estudio confirmó la capacidad del acondicionamiento de intensidad reducida para obtener remisiones a largo plazo en pacientes no candidatos a trasplante con acondicionamiento convencional. Los resultados sugieren que el desarrollo de enfermedad injerto contra huésped crónica juega un papel fundamental en el control de la enfermedad y en la obtención de mejora en términos de supervivencia en los pacientes tras el trasplante.

Justificación

Con el trabajo previo demostramos que era posible utilizar un acondicionamiento de intensidad reducida en pacientes de alto riesgo no candidatos a un acondicionamiento convencional por el elevado riesgo de mortalidad asociada al trasplante. Los resultados globales de mortalidad y la supervivencia global resultaron similares, pero es importante remarcar que los pacientes a los que se

Objetivo 2: Estudio de eficacia del Alo-TIR en LMA y SMD a largo plazo

aplicó el acondicionamiento de intensidad reducida no eran candidatos a un trasplante convencional. Por lo tanto desde nuestro punto de vista se alcanzó el objetivo principal que era ofrecer la posibilidad a los pacientes de beneficiarse del efecto injerto contra tumor de un trasplante alogénico.

El trabajo anterior tuvo un seguimiento poco prolongado y su objetivo no fue valorar la eficacia en una enfermedad concreta, dado que la población fue heterogénea en cuanto a su enfermedad de base.

En este segundo trabajo nos propusimos analizar la eficacia del acondicionamiento de intensidad reducida en un grupo de pacientes homogéneo en cuanto a su enfermedad y analizar los resultados a largo plazo, con la intención de valorar el trasplante no solo en sus fases iniciales sino como estrategia potencialmente curativa.

Pacientes y métodos:

Se incluyeron 93 pacientes con LMA o SMD que recibieron un Alo-TIR de un hermano HLA-idéntico dentro de un estudio prospectivo fase II, que se llevó a cabo en seis hospitales españoles entre 1998 y 2005. Los criterios de inclusión fueron tener una LMA o SMD que requiriese un Alo-TPH y que el paciente no fuese candidato a un Alo-CONV por un elevado riesgo de MRT. Los criterios de exclusión incluyeron: Creatinina o bilirrubina superior a dos veces el valor máximo de la normalidad de cada centro, elevación de AST o ALT tres veces superior al valor máximo de la normalidad de cada centro o positividad para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Los pacientes se incluyeron en el estudio una vez aprobado el protocolo por la Agencia Española del Medicamento y los comités locales de cada centro participante y tras haber firmado el consentimiento informado.

Tabla 12: Características de los pacientes.

| | NÚMERO | % |
|---|----------------|-----|
| Edad: mediana (rango), años | 53 (21-70) | |
| Edad \geq 60 años. | 38 | 41 |
| Sexo (mujer). N(%) | 36 | 39 |
| Diagnóstico. N(%) | | |
| LMA | 59 | 63 |
| Riesgo citogenético bueno/intermedio | 39 | 66* |
| Riesgo citogenético alto | 14 | 24* |
| Riesgo citogenético no disponible/no mitosis | 6 | 10* |
| SMD | 34 | 37 |
| IPSS intermedio-1 | 6 | 18 |
| IPSS intermedio-2 | 18 | 53 |
| IPSS alto | 7 | 21 |
| IPSS no disponible | 3 | 8 |
| Respuesta al tratamiento previo | | |
| No tratado | 26 | 28 |
| Quimiosensible (RC tras la última quimioterapia) | 46 | 49 |
| Quimiorrefractario (NO RC tras la última quimioterapia) | 21 | 22 |
| Trasplante autólogo previo | 11 | 12 |
| Motivo para haber recibido un Alo-TIR | | |
| Trasplante previo | 2 | 2 |
| Edad avanzada | 65 | 70 |
| Comorbilidades o estado general por escala ECOG>1 | 4 | 4 |
| Más de una causa | 22 | 21 |
| Céulas CD 34* infundidas por kg (x10) | 4.5 (1.6-15.6) | |
| Seguimiento (meses), mediana (rango) | 43 (3-89) | |

*El porcentaje aplica sólo a los pacientes con LMA, # El porcentaje aplica sólo a los pacientes con SMD. LMA: Leucemia mieloide aguda, SMD: Síndrome mielodisplásico. Alo-TIR: Trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida. CMV: Citomegalovirus. RC: Remisión completa. IPSS: Índice pronóstico internacional. N: Número

Las características de los pacientes están detalladas en la **tabla 12**. La edad mediana fue de 53 años (rango 21-70 años) y un 41% de los pacientes tenían una edad \geq 60 años. Se incluyeron 59 pacientes (63%) con LMA y 34 (37%) con SMD. Los pacientes con SMD y menos de un 10% de blastos recibieron el trasplante como primera línea sin tratamiento previo, mientras que aquéllos con más de un 10% de blastos recibieron quimioterapia tipo LMA previamente al trasplante.

Objetivo 2: Estudio de eficacia del Alo-TIR en LMA y SMD a largo plazo

El acondicionamiento utilizado fue el mismo que se ha explicado previamente y consistió en la combinación de fludarabina en dosis total de 150 mg/m² (repartidos durante los días -9 a -5), con busulfán en dosis total de 8 ó 10 mg/kg o su dosis equivalente endovenosa (repartidos en los días -6 a -4). Las células se infundieron en el día 0 y en todos los casos se obtuvieron de sangre periférica de donantes familiares HLA idénticos tras movilización con G-CSF. La profilaxis de la EICR se basó en el uso de ciclosporina en todos los casos, en combinación con un agente anti-metabolito que fue metotrexate en 82 casos y micofenolato mofetil en 11 pacientes. La dosis de ciclosporina se ajustó a los niveles serios. El motivo de usar dos dosis diferentes de busulfán y el uso de micofenolato mofetil en lugar de metotrexate se debió a una modificación incluida en 2004 con la intención de reducir más la toxicidad relacionada con el acondicionamiento. Dado que los resultados entre estos pacientes no fueron distintos se analizaron todos juntos.

La profilaxis anti-infecciosa fue determinada por cada centro, pero en todos los casos incluyó el uso de trimetoprim-sulfamtoazol o pentamidina y la monitorización del CMV semanalmente, con la administración de ganciclovir o fosaren en caso de reactivación del virus.

Se permitió la infusión de linfocitos del donante, en casos de recidiva o quimerismo mixto persistente al retirar por completo la inmunodepresión.

Consideraciones estadísticas

Los objetivos principales del presente estudio fueron el análisis de la supervivencia global (SG), supervivencia libre de progresión (SLP), mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) y recidiva. Las probabilidades de SG y SLP se estimaron a partir del momento del trasplante usando las curvas de Kaplan y Meier, mientras que la MRT y la recidiva de la enfermedad se consideraron eventos competitivos y se analizaron mediante el cálculo de incidencia acumulada, teniendo en cuenta el riesgo competitivo correspondiente. También se analizó mediante incidencia acumulada la enfermedad injerto contra receptor (EICR) y el injerto hematopoyético. El análisis univariado de los factores que influyeron en estas variables se realizó mediante el test de Cox univariado, mientras que para la SG y la SLP se utilizó el test log-rank. Todos los factores que resultaron tener al menos una tendencia en el análisis univariado definida como un valor de $P \leq 0.1$ fueron incluidos posteriormente en un análisis multivariado, realizado mediante el test de

Objetivo 2: Estudio de eficacia del Alo-TIR en LMA y SMD a largo plazo

Cox multivariado y teniendo en cuenta los riesgos proporcionales a lo largo del tiempo. Cuando se incluyó el desarrollo de EICR como factor que potencialmente influyó en uno de las variables analizadas se introdujo la variable EICR como una variable tiempo dependiente. Las curvas del impacto de EICR crónica en la supervivencia y recidiva se realizaron con la intención de representar el impacto de dicho factor en las variables analizadas.

Se definió como enfermedad quicio-sensible cuando el paciente alcanzó remisión completa (RC) tras la última quimioterapia administrada, mientras que se consideró quimiorrefractario aquel paciente que no alcanzó RC tras el último tratamiento recibido.

La enfermedad se consideró en fase precoz de acuerdo a los criterios previamente establecidos y comúnmente utilizados en el contexto del trasplante (*Appelbaum FR, 2005; de Lima M 2006*). Específicamente se incluyeron en esta categoría los pacientes con LMA o SMD en RC tras la quimioterapia de inducción y los pacientes con SMD que no recibieron ningún tratamiento previo al trasplante.

El injerto de neutrófilos se definió como el primero de tres días consecutivos con más de $0.5 \times 10^9/L$ neutrófilos y el injerto de plaquetas como el primero de 3 días consecutivos con recuentos superiores a $20 \times 10^9/L$ y sin recibir transfusiones. El desarrollo y el estadiaje de EICR se realizaron de acuerdo a los criterios establecidos (*Przepiorka D, 1995*) y siempre que fue posible se realizó una biopsia del órgano afectado para confirmar el diagnóstico. La diferenciación entre EICR aguda y crónica no se realizó conforme a la definición clásica basada en el día +100 sino que se tuvo en cuenta la recomendación del National Health Institute y se definió de acuerdo a los hallazgos clínicos e histológicos (*Filipovich AH, 2005*)

Los estudios de quimerismo se realizaron mediante el estudio de locus de minisatélite usando la reacción en cadena de la polimerasa. Se consideró quimerismo completo la presencia de un 100% de células derivadas del donante y en aquellos casos en que se disponía de estudios de subpoblaciones la determinación del quimerismo se realizó en base al resultado del quimerismo de los linfocitos T (N=46)

Resultados

Recuperación hematopoyética y estudios de quimerismo

Todos los pacientes, excepto dos que murieron en el día +2 y +6, fueron evaluables para el injerto hematopoyético. La recuperación de neutrófilos se produjo de mediana en el día +17 (rango 7-27) y la de plaquetas en el día +11 (rango 0-59). No se produjeron fallos de injerto primarios ni secundarios.

Se realizaron estudios de quimerismo en 86 (92%) pacientes. La mediana para alcanzar la situación de quimerismo completo fue de 30 días (rango 17-240) cuando se estudió en celularidad total y de 100 días (rango 17-731) cuando se realizó un estudio específico en linfocitos T ($P < 0.01$)

Enfermedad Injerto Contra Receptor

Treinta y tres pacientes (35%) desarrollaron EICR aguda y en 14 de ellos (15%) se catalogó como severa (grado 3-4), para unas incidencias acumuladas de EICR global y grado 3-4 del 34% (IC 95%: 44-66%) y 45% (IC 95%:7-21%), respectivamente.

Cincuenta y un pacientes desarrollaron EICR crónica y en 39 casos (50%) fue extensa, para unas incidencias acumuladas del 53% (IC 95%: 44-65%) y 45% (IC 95%:35-58%), respectivamente. En la **tabla 13** se detallan las características de la EICR crónica. En el último seguimiento, se había podido retirar la inmunosupresión por completo en 29 pacientes (35%) tras una mediana de 6 meses (rango 2-49 meses) desde el trasplante. Diecinueve de los 43 pacientes vivos en el último seguimiento (43%) dejaron de recibir tratamiento inmunosupresor tras una mediana de 9 meses (rango: 3-41) tras el trasplante.

Supervivencia global

En el último seguimiento 44 (47%) pacientes estaban vivos y 49 (53%) habían muerto como consecuencia de recidiva de la enfermedad de base ($N = 27$, 29%), EICR ($N = 12$, 13%), infecciones ($N = 5$, 5%) u otra toxicidad ($N = 5$, 5%). La probabilidad de supervivencia global en la serie completa a los 4 años fue del 45% (IC 95%: 34-56%) y fue similar entre los pacientes con LMA y con SMD: 42 (IC 95%: 28-56%) y 49% (IC 95%:31-76%), respectivamente ($P = 0.4$) La **figura 5** muestra las curvas de SG y SLP en la población general y en LMA y SMD.

Tabla 13: Características de la enfermedad injerto contra huésped crónica

| | NÚMERO | % |
|---|-------------|---------|
| EICR, Incidencia acumulada a 4 años (IC 95%) | | |
| Global | 53% | (44-65) |
| Extensa | 45% | (33-58) |
| Tipo de aparición | | |
| Progresiva | 30 | 58 |
| De Novo | 17 | 33 |
| Aquiescente | 4 | 9 |
| Órganos afectados, Mediana (rango) (1) | 3 (1-5) | |
| Piel | 36 | 72 |
| Mucosa Oral | 35 | 70 |
| Ojos | 10 | 20 |
| Gastrointestinal | 14 | 28 |
| Hepático | 34 | 68 |
| Pulmonar | 11 | 22 |
| Necesidad de segunda línea de tratamiento (2) | 16 | 33 |
| Pacientes sin inmunodepresión en el último seguimiento (3) | 19 | 44 |
| Respuesta al tratamiento (4) | | |
| Respuesta completa | 16 | 33 |
| Respuesta parcial | 21 | 44 |
| Muerte por EICR | 11 | 23 |
| Índice de Karnofsky último seguimiento, mediana (rango) (5) | 90 (70-100) | |
| 100 | 9 | 30 |
| 90 | 13 | 43 |
| 70-80 | 8 | 27 |

Pacientes evaluables: (1) 50, (2) 48, (3) 43, (4) 48 (5)41.

La **tabla 14** detalla los factores que influyeron en la supervivencia global en el análisis univariado y multivariado. El único factor asociado a peor supervivencia en el análisis multivariado fue la ausencia de desarrollo de EICR crónica (Hazard ratio (HR) 6.1; IC 95%:3.3-11.3; P<0.001)

Tabla 14: Análisis de los factores relacionados con la supervivencia global

| Factor | ANÁLISIS UNIVARIADO | | ANÁLISIS MULTIVARIADO | | |
|--------------------------|---------------------|-------|-----------------------|----------|--------|
| | LR | P | LR | IC 95% | P |
| QT pre-TPH | 3 | 0.08 | - | | |
| >5% blastos pre-TPH | 5.5 | 0.02 | - | | |
| Citogenética Alto Riesgo | 3.4 | 0.06 | - | | |
| Ausencia EICR c | 6.7 | <0.01 | 6.1 | 3.6-12.5 | <0.001 |
| Fase avanzada | 6.8 | 9 | - | | - |

Supervivencia libre de progresión y recidiva

En el momento del último seguimiento, 33 pacientes habían recidivado (45%) tras una mediana de 4 meses (0.6-49) post-trasplante. Las incidencias acumuladas de recidiva a los 3 meses, 1 y 4 años fueron respectivamente: 15% (IC 95%: 9-25%); 29% (IC 95%: 21-40%) y 37% (IC 95%: 32-59%) Los factores asociados con una mayor incidencia de recidiva en el análisis univariado fueron la refractariedad a la quimioterapia previa, citogenética de alto riesgo, la presencia de más de un 5% de blastos en médula ósea y la ausencia de desarrollo de EICR crónica. En el análisis multivariado los factores relacionados con una mayor recidiva fueron la ausencia de desarrollo de EICR crónica (HR 6.5; IC 95%: 3.1-13.8; P<0.001), seguida de una fase avanzada en el momento del trasplante (HR 2.2; IC 95%: 1.1- 4.4; P= 0.3).

La probabilidad de SLP a 4 años en la población general fue del 43% (IC 95%: 32-54%) y no fue estadísticamente diferente entre los pacientes con LMA y SMD: 39% (IC 95%: 26-52%) y 49% (IC 95%: 31-67%), respectivamente (P=0.3). Los factores que influyeron en la SLP en el análisis univariado se detallan en la **tabla 15**. En el análisis multivariado las variables que se asociaron a peor SLP fueron la ausencia de desarrollo de EICR crónica (HR 5.3; IC 95%: 2.4-13.8; P<0.001), seguida de una fase avanzada en el momento del trasplante (HR 2.6; IC 95%: 1.2- 5.4; P= 0.01).

Un total de 11 pacientes recibieron infusión de linfocitos del donante (en todos los casos por progresión de la enfermedad de base) tras una mediana de 4.3 meses (rango 4.6) post-trasplante. Cinco pacientes obtuvieron RC tras la infusión de linfocitos del donante y cuatro la mantenían en el último seguimiento (1, 9, 10 y 35 meses tras la infusión de linfocitos), mientras que los seis pacientes que no

Objetivo 2: Estudio de eficacia del Alo-TIR en LMA y SMD a largo plazo

respondieron a la infusión de linfocitos fallecieron como consecuencia de la enfermedad de base.

Figura 5: Curvas de supervivencia global y supervivencia libre de progresión

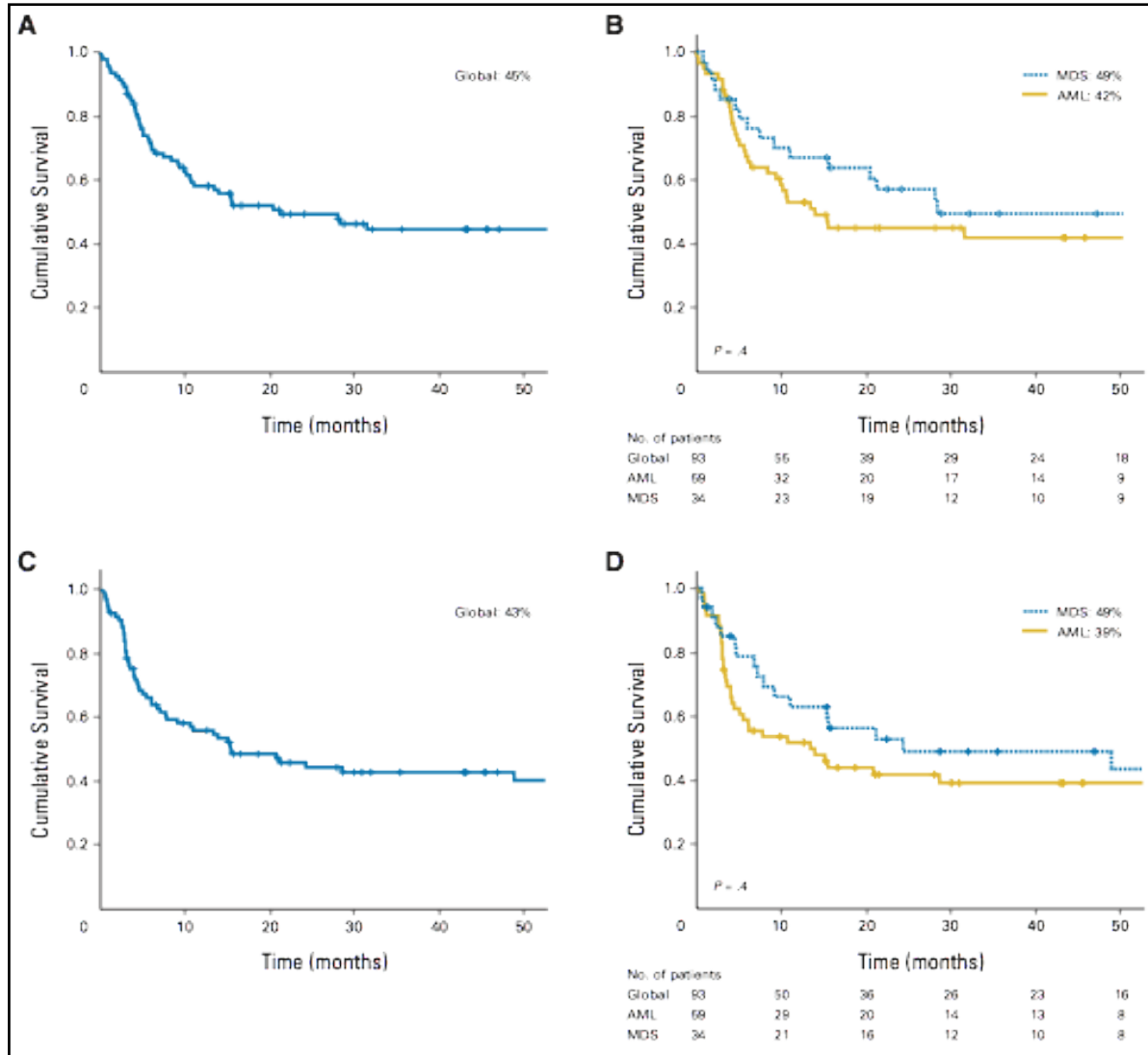


Tabla 15: Análisis de los factores relacionados con la supervivencia libre de progresión

| Factor | ANÁLISIS UNIVARIADO | | ANÁLISIS MULTIVARIADO | | |
|--------------------------|---------------------|--------|-----------------------|---------|--------|
| | LR | P | LR | IC 95% | P |
| QT pre-TPH | 4 | 0.04 | - | | |
| >5% blastos pre-TPH | 1.9 | 0.08 | - | | |
| Citogenética Alto Riesgo | 1.9 | 0.08 | - | | |
| Ausencia EICR c | 6.3 | <0.001 | 4.2 | 1.9-9.4 | <0.001 |
| Fase avanzada | 6.5 | 0.01 | 2.6 | 1.2-5.4 | 0.01 |

Mortalidad relacionada con el trasplante

Dieciocho pacientes fallecieron como consecuencia de complicaciones relacionadas con el trasplante tras una mediana de 4.3 meses (rango 0-21) post-trasplante. Las incidencias acumuladas de MRT a los 3 meses, 1 y 4 años fueron: 8% (IC 95%: 4-15%), 16% (IC 95%: 10-26%) y 20% (IC 95%: 14-32%), respectivamente. Los factores relacionados con una mayor incidencia de MRT en el análisis univariado fueron el desarrollo de EICR aguda, edad superior de 60 años, más de un 5% pre-TPH y la ausencia de quimioterapia previa. En el análisis multivariado el único factor que mantuvo significación estadística fue el desarrollo de EICR aguda (HR: 3.7; IC 95%: 1.4-13; P=0.005), mientras que la edad superior a 60 años mostró una tendencia estadística (HR 2.6; IC 95%:1-6.9: P=0.059).

Los resultados de esta parte del trabajo fueron publicados en forma de artículo en Journal of Clinical Oncology, a continuación se aporta una copia del trabajo tal y como fue publicado.

Objetivo 2: Estudio de eficacia del Alo-TIR en LMA y SMD a largo plazo

Artículo 2: Valcarcel D, Martino R, Caballero D et al. "Sustained remissions of high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic transplantation: Chronic graft versus host disease is the strongest factor improving survival"

VOLUME 26 · NUMBER 4 · FEBRUARY 1 2008

JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

ORIGINAL REPORT

Sustained Remissions of High-Risk Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome After Reduced-Intensity Conditioning Allogeneic Hematopoietic Transplantation: Chronic Graft-Versus-Host Disease Is the Strongest Factor Improving Survival

David Valcárcel, Rodrigo Martino, Dolores Caballero, Jesus Martin, Christelle Ferrá, Jose B. Nieto, Antonia Sampol, M. Teresa Bernal, Jose L. Piñana, Lourdes Vázquez, Jose M. Ribera, Joan Besalduch, Jose M. Moraleda, Dolores Carrera, M. Salut Brunet, Jose A. Perez-Simón, and Jorge Sierra

From the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Universitat Autònoma Barcelona), Barcelona; Hospital Clínic, Universitari de Salamanca, Salamanca; Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona; Hospital Morales Meseguer, Murcia; Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca, Mallorca; Hospital Central de Asturias, Oviedo, Spain.

Submitted March 9, 2007; accepted October 24, 2007; published online ahead of print at www.jco.org on December 17, 2007.

Supported in part by the Instituto de Salud Carlos III (Expedient Grant No. CM0600.139, Ministerio de Sanidad to J.L.P.) and Grants No. PI052312 and RD0600200707 to J.S.I.; the Instituto de Recerca Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (J.L.P.); and CURSI (Grant No. 2005SGR01075 to J.S.I.), Catalonia, Spain.

Both D.V. and R.M. contributed equally to this work and should be considered co-first authors.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest and author contributions are found at the end of this article.

Corresponding author: David Valcárcel, MD, H. Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Màg. Claret 167, Barcelona, Spain 08025. e-mail: dvalcarcel@santpau.es.

© 2008 by American Society of Clinical Oncology

0732-183X/08/2604-577/\$20.00

DOI: 10.1200/JCO.2007.11.1641

ABSTRACT

Purpose

Reduced-intensity conditioning (RIC) for allogeneic stem-cell transplantation (allo-SCT) reduces nonrelapse mortality (NRM). This reduction makes it possible for patients who are ineligible for high-dose myeloablative conditioning allo-SCT to benefit from graft-versus-leukemia reaction. In this multicenter, prospective study of patients with acute myeloid leukemia (AML) and high-risk myelodysplastic syndrome (MDS), we investigated the efficacy of RIC allo-SCT from a human leukocyte antigen-identical sibling by using a regimen that uses fludarabine and busulfan.

Patients and Methods

Ninety-three patients with AML ($n = 59$) and MDS ($n = 34$) were included, and the median age was of 53 years. Follow-up for survivors was 43 months (range, 3 to 89 months). The conditioning regimen consisted of fludarabine (150 mg/m^2) and oral busulfan (8 to 10 mg/kg). All except one patient received mobilized peripheral blood stem cells. Graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis consisted of cyclosporine and methotrexate or mycophenolate mofetil.

Results

The 100-day, 1-year, and 4-year incidences of NRM were 8, 16%, and 21%, respectively. The 1- and 4-year relapse cumulative incidences were 23% and 37%, respectively, and leukemia recurrence was the main cause of death. The 4-year disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) rates were 43% and 45%, respectively. The 4-year cumulative incidence of chronic GVHD was 53% (45% extensive), and its development was the major factor associated with lower relapse incidence and improved DFS and OS.

Conclusion

Our results confirm the capacity of this RIC regimen to obtain long-term remissions in patients ineligible for a conventional allo-SCT. The results suggest an important role of the development of chronic GVHD in reducing relapse and improving DFS and OS.

J Clin Oncol 26:577-584. © 2008 by American Society of Clinical Oncology

INTRODUCTION

Initial uncertainties about reduced-intensity conditioning (RIC) regimens for allogeneic transplantation (allo-SCT) have been convincingly answered, by the demonstration of their efficacy in allowing engraftment and in decreasing nonrelapse mortality (NRM) in patients ineligible for conventional (high-dose conditioning) allo-SCT.¹⁻³ Currently, a key aspect to be investigated is whether RIC regimens have a graft-versus-leukemia (GvL) effect that is strong enough to

cure high-risk patients, even those who have relapsed after autologous SCT.

Up-to-date, conventional allo-SCT is considered the best approach for patients with acute myeloid leukemia (AML) and high-risk myelodysplastic syndrome (MDS), because it combines high-dose chemotherapy with an immune-mediated GvL reaction.^{4,7} However, this approach is not recommended in many patients because of an unacceptable high risk of NRM (eg, from second transplants, poor performance status, other comorbidities, or advanced age). An option for this

Artículo 2: Valcarcel D, Martino R, Caballero D et al. "Sustained remissions of high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic transplantation: Chronic graft versus host disease is the strongest factor improving survival"

Valcarcel et al

group is autologous SCT, but the advantage compared with chemotherapy in high-risk AML is unclear.^{9,7} In contrast, it would be of interest to know if these patients could benefit from a GvL effect, especially when the tumor burden is low.¹⁰

To estimate the potential of this approach, Lazarus et al¹¹ have reviewed the experiences from several groups that used RIC regimens in AML.¹²⁻¹⁸ These studies present several problems that hamper firm conclusions: most studies are retrospective; include diverse diagnoses and usually only a low number of AML/MDS; use different conditioning regimens and are often heterogeneous; pool sibling and unrelated transplants in the same study; and include bone marrow transplantation (BMT) and peripheral blood stem-cell transplantation (PBSCT) as sources (with or without in vivo or ex vivo T-cell depletion) in the same study. These studies report an NRM that ranges from 5% to 51%, a relapse incidence between 11% and 45%, an overall survival (OS) between 17% and 68%, and a disease-free survival (DFS) that ranges from 31% to 80%.

The present study reports the outcome of patients with AML/MDS who underwent RIC allo-SCT with busulfan (8 to 10 mg/m²) and fludarabine (150 mg/m²) in six Spanish centers. The prospective design of the study and the long follow-up (median, 43 months) allow the analysis of patients who experienced late treatment failures with this RIC allo-SCT. All the patients were candidates for allo-SCT, but—for different reasons, mainly advanced age—the anticipated early high NRM precluded the use of conventional conditioning. Our results of 45% OS despite the presence of several high-risk factors in most patients (with 20% of them undergoing SCT with refractory disease) are encouraging. Of note, our study confirms that chronic GVHD is the most important factor for reducing relapses and for improving DFS and OS after RIC allo-SCT for myeloid malignancies.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Ninety-three patients with AML/MDS received fludarabine and busulfan for RIC allo-SCT from human leukocyte antigen (HLA)-identical siblings on a phase II prospective trial conducted in six Spanish centers between 1998 and 2005. The inclusion criteria were an AML considered for allo-SCT but at high risk for NRM with conventional conditioning; and provision of written informed consent. Exclusion criteria were creatinine more than twice the upper limit of normal (ULN); AST and/or ALT more than three times the ULN; bilirubin more than twice the ULN; other nonhematologic malignancies; or HIV positive status. Patient characteristics are listed in Table 1.¹⁹ The median age was 53 years (range, 21 to 70 years), and 38 patients (41%) were aged ≥ 60 years. The diagnoses were AML in 59 patients (63%) and MDS in 34 patients (37%). Patients who had MDS with increased blasts underwent the transplantation as first-line therapy if they had less than 10% bone marrow blasts. If they had more than 10% blasts, they received AML-type chemotherapy first and then proceeded to allo-SCT.

Patients were enrolled after protocol approval by the Spanish Drug Regulator Agency and by local research ethical committees, and written informed consent was obtained from patients and donors before conditioning.

Conditioning Regimen and Graft-Versus-Host-Disease Prophylaxis

The conditioning regimen consisted of intravenous (IV) fludarabine 150 mg/m² (30 mg/m² on days -9 to -5) and oral busulfan 8 to 10 mg/kg (1 mg/kg every 6 hours on days -6 to -4); stem cells were infused on day 0. All patients received mobilized peripheral blood stem cells (except for one patient, who received bone marrow) from an HLA-identical sibling.

Table 1. Patient Characteristics

| Characteristic | Patients (N = 93) | |
|--|-------------------|-----|
| | No. of Patients | % |
| Age, years | | |
| Median | 53 | |
| Range | 21-70 | |
| < 60 | 9 | 10 |
| ≥ 60 | 38 | 41 |
| Donor age, years | | |
| Median | 56 | |
| Range | 25-74 | |
| Sex | | |
| Female | 36 | 39 |
| Male | 57 | 61 |
| Female:male donor:receptor | 24 | 26 |
| Diagnosis | | |
| Acute myeloid leukemia | 59 | 63 |
| Good/normal cytogenetic risk | 39 | 66* |
| High cytogenetic risk | 14 | 24* |
| Not available/no mitosis | 6 | 10* |
| Myelodysplastic syndrome ¹⁹ | 34 | 37 |
| IPSS intermediate-1 | 6 | 18† |
| IPSS intermediate-2 | 18 | 53† |
| IPSS high | 7 | 21† |
| Not available | 3 | 8† |
| Response to chemotherapy at transplantation | | |
| Untreated | 26 | 28 |
| Chemotherapy-sensitive (CR achieved with last CT) | 46 | 49 |
| Chemotherapy-refractory (CR not achieved with CT) | 21 | 22 |
| Previous autologous SCT | 11 | 12 |
| Two or more lines before allo-SCT | 19 | 20 |
| Reason for reduced intensity conditioning | | |
| Prior autologous SCT | 2 | 2 |
| Advanced age | 65 | 70 |
| Significant comorbidities or PS > 1 | 4 | 4 |
| Two or more causes | 22 | 24 |
| CMV (recipient/donor combinations) | | |
| +/+ or +/- | 85 | 91 |
| -/+ or -/- | 8 | 9 |
| CD 34 infused per kg ($\times 10^6$) | | |
| Median | 4.5 | |
| Range | 1.6-15.6 | |
| Follow up for survivors, months | | |
| Median | 43 | |
| Range | 3-89 | |

Abbreviations: IPSS, international prognostic scoring system; CR, complete remission; CT, chemotherapy; SCT, stem-cell transplantation; allo-SCT, allogeneic stem-cell transplantation; PS, performance status; CMV, cytomegalovirus.
*Percentage refers only to acute myeloid leukemia.
†Percentage refers only to myelodysplastic syndrome.

Graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis consisted of cyclosporine (CsA) in all patients and a short course of methotrexate (MTX) (on days 1, 3, and 6) followed by folinic acid rescue for 82 patients. Mycophenolate mofetil (MMF) 1 g every 8 hours was used instead of MTX in 11 patients. The CsA dose was maintained until 3 months after transplantation and then was tapered if no acute GVHD appeared. In 2004, there was a modification in the conditioning regimen and the GVHD prophylaxis to further reduce drug-related toxicity. Patients previously reported as having the highest risk of 1-year NRM received busulfan 8 mg/kg instead of 10 mg/kg and received MMF instead of

Artículo 2: Valcarcel D, Martino R, Caballero D et al. "Sustained remissions of high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic transplantation: Chronic graft versus host disease is the strongest factor improving survival"

FLU-BU RIC in AML/MDS

MTX.²⁰ Because all outcomes were identical in these 11 patients, they are described together with the other 82 patient cases.

Anti-infective measures were determined by local protocols and included (in all instances) the following: trimethoprim/sulfamethoxazole or nebulized pentamidine as prophylaxis for *Pneumocystis jirovecii* infections; and twice-weekly monitoring for cytomegalovirus (CMV) reactivation, with administration of pre-emptive ganciclovir or foscarnet therapy when monitoring resulted in positive results.

Donor lymphocyte infusions (DLIs) were given because of relapse or because of persistent mixed chimerism after CsA tapering.

Statistical Considerations and Definitions

The main end points of the study were OS, DFS, NRM, and relapse. The probabilities of OS and DFS were estimated from the time of transplantation by using Kaplan-Meier curves,²¹ whereas NRM and relapse were calculated by using cumulative incidence estimates and by taking into account the competing risk structure.^{22,23} Other post-transplantation outcomes that were calculated by using cumulative incidence estimates were hematopoietic recovery and acute and chronic GVHD. Univariate analyses of the association of various clinical risk factors with these post-transplantation outcomes were calculated using univariate Cox regression models, whereas the log-rank test was used for OS and DFS.^{22,23} Multivariate analyses were performed by Cox proportional hazards regression, and variables with a *P* value < .1 in the prior univariate testing were included. The assumption of proportional hazards over time was tested for all explanatory covariates by using a time-dependent covariate. Quantitative variables that were found to have an impact on any outcome were reanalyzed as categorical variables. Tests of significance were two-sided and had a significance level of .05 or less. All statistical analyses were performed with SPSS version 13.0 (SPSS, Chicago, IL) with the exception of the cumulative incidence analyses, which were carried out with NCSS 2004 (Number Cruncher Statistical System; NCSS, Kaysville, UT). The variables studied in the univariate analysis are listed in Table 2. If acute or chronic GVHD (included individually as time-dependent covariates) were found to have an impact on post-transplantation outcomes in the final multivariate Cox analysis, plots were constructed to illustrate visually the effects of GVHD on these outcomes, as described elsewhere.²⁴

Chemotherapy sensitivity was defined as the achievement of complete remission (CR) after the last course of chemotherapy (CT), whereas chemotherapy refractoriness included responses different than CR. Those patients who did not receive CT before allo-SCT were described as untreated.

An early disease status was defined according to accepted criteria.^{25,26} Specifically, this category included patients with poor-prognosis AML or refractory anemia with excess blasts-type 2 in first CR after induction chemotherapy and with untreated refractory anemia with excess blasts-type 1 (bone marrow blasts < 10%).

Neutrophil and platelet engraftment were defined as the first of three consecutive days with an absolute neutrophil count greater than $0.5 \times 10^9/L$ and an untransfused platelet count greater than $20 \times 10^9/L$. Acute and chronic GVHD were graded according to standard criteria²⁷; the diagnoses of acute and chronic GVHD were not made on the basis of the classical 100-day cutoff only, but diagnoses were made by the clinical presentation and the histopathologic findings of biopsies, as recommended recently by an NIH working group.²⁸ Response and relapse were defined according to standard hematologic criteria. All patients who survived at least 15 days were evaluated for hematologic recovery.

Chimerism analyses was performed by using a polymerase chain reaction (PCR) of informative minisatellite loci, as previously specified.²⁹ Complete donor chimerism (CDC) was defined as the presence of 100% donor DNA in the sample analyzed. CDC was defined on the basis of T-cell chimerism, if available (*n* = 46), or on unfractionated nucleated cells (*n* = 86).

RESULTS

Engraftment and Chimerism

All but two patients, who died early (day 2 and 6), were assessable for hematologic reconstitution. Neutrophil recovery occurred in all patients at a median of 17 days (range, 7 to 27 days), and platelet recovery occurred at a median of 11 days (range, 0 to 59 days). There were neither primary nor secondary graft failures.

Eighty-six patients (92%) were assessable for chimerism studies. The median time to reach complete donor chimerism (CDC) was shorter in total nucleated cells than in T lymphocytes (median, 30 days [range, 17 to 240 days] v median, 100 days [range, 17 to 731 days], respectively; *P* < .01).

GVHD

Thirty-three patients (35%) developed acute GVHD, and 14 of these (15%) were severe (grade 3 to 4). The cumulative incidences were 34% (95% CI, 26% to 46%) and 12% (95% CI, 7% to 21%), respectively.

Fifty-one patients developed chronic GVHD, which resulted in a 4-year cumulative incidence of 53% (95% CI, 44% to 65%). Thirty-nine patients (50%) developed extensive chronic GVHD, which resulted in a 4-year cumulative incidence of 45% (95% CI, 35% to 58%). The characteristics of chronic GVHD are listed in Table 3.

Table 2. Univariate and Multivariate Analyses of Outcomes

| Variable* | Overall Survival | | | | Disease-Free Survival | | | | | Relapse | | NRM | | | | |
|---------------------------------|------------------|----------|-----|-------------|-----------------------|-----|----------|-----|------------|----------|-----|-------------|----------|-----|------------|----------|
| | UA | | MA | | UA | | MA | | | MA | | MA | | | | |
| | LR | <i>P</i> | HR | 95% CI | <i>P</i> | LR | <i>P</i> | HR | 95% CI | <i>P</i> | HR | 95% CI | <i>P</i> | HR | 95% CI | <i>P</i> |
| Chemotherapy-refractory disease | 3 | .08 | NA | | NS | 4 | .04 | NA | | NS | NA | | NS | NA | | NS |
| > 5% blast in BM at SCT | 5.5 | .02 | NA | | NS | 1.9 | .08 | NA | | NS | NA | | NS | NA | | NS |
| High-risk cytogenetics | 3.4 | .06 | NA | | NS | 1.9 | .08 | NA | | NS | NA | | NS | NA | | NS |
| Absence of chronic GVHD† | 6.7 | < .001 | 6.1 | 3.6 to 12.5 | < .001 | 6.3 | < .001 | 4.2 | 1.9 to 9.4 | < .001 | 5.3 | 2.4 to 13.8 | < .001 | NA | | NS |
| Acute GVHD† | NA | NS | NA | | NS | NA | NS | NA | | NS | NA | | NS | 3.7 | 1.5 to 9.5 | .006 |
| Advanced phase | 6.8 | .009 | NA | | NS | 6.5 | .01 | 2.6 | 1.2 to 5.4 | .01 | 2.2 | 1.1 to 4.4 | .03 | NA | | NS |
| Age > 60 years | NA | NS | NA | | NS | NA | NS | NA | | NS | NA | | NS | 2.6 | 1 to 6.8 | .058 |

NOTE. The table reflects only those variables that were statistically significant in univariate and/or multivariate analyses.

Abbreviations: NRM, nonrelapse mortality; UA, univariate analysis; MA, multivariate analysis; LR, log-rank; HR, hazard ratio; NA, not applicable; NS, not statistically significant (*P* > .1 for univariate analysis and *P* > .05 for multivariate analysis); BM, bone marrow; SCT, stem-cell transplantation; GVHD, graft-versus-host disease.

*Univariate analysis for overall survival, disease-free survival, relapse, and nonrelapse mortality included the following variables: age (as a continuous variable and as a categorical variable [older or younger than 60 years]), donor and recipient sex, Eastern Cooperative Oncology Group performance status, cytomegalovirus serostatus, disease status, sensitivity to chemotherapy, number of blasts in bone marrow at stem-cell transplantation (> 5% blasts), cytogenetics, time from diagnosis to stem-cell transplantation, previous autologous stem-cell transplantation, infused CD 34+ cells ($> 8 \times 10^6/kg$), and acute or chronic graft-versus-host disease.

†The log-rank test was used for all variables except for the absence of chronic graft-versus-host disease.

Artículo 2: Valcarcel D, Martino R, Caballero D et al. "Sustained remissions of high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic transplantation: Chronic graft versus host disease is the strongest factor improving survival"

Valcarcel et al

Table 3. Chronic GVHD Characteristics

| Characteristic | Patients | |
|--|-----------------|----|
| | No. of Patients | % |
| Chronic GVHD | 51 | 65 |
| 4-year cumulative incidence, % | 53 | |
| 95% CI | 44 to 65 | |
| Extensive chronic GVHD | 39 | 50 |
| 4-year cumulative incidence, % | 45 | |
| 95% CI | 33 to 58 | |
| Onset of chronic GVHD | | |
| Progressive | 30 | 58 |
| de novo | 17 | 33 |
| Quiescent | 4 | 9 |
| Organ affected* | | |
| Median No. affected | 3 | |
| Range | 1-5 | |
| Skin | 36 | 72 |
| Oral mucosa | 35 | 70 |
| Eyes | 10 | 20 |
| Gastrointestinal | 14 | 28 |
| Liver | 34 | 68 |
| Lung | 11 | 22 |
| Requirement of second-line therapy† | 16 | 33 |
| IS medication stopped at last follow-up‡ | 19 | 44 |
| Response to therapy§ | | |
| Complete response | 16 | 33 |
| Partial response | 21 | 44 |
| Death as a result of chronic GVHD | 11 | 23 |
| KI at last follow-up¶ | | |
| Median | 90 | |
| Range | 0 to 100 | |
| 100 | 9 | 30 |
| 90 | 13 | 43 |
| 70-80 | 8 | 27 |

Abbreviations: GVHD, graft-versus-host disease; IS, immunosuppressive; KI, Karnofsky index.

*Fifty assessable patients. Three patients had missing data.

†Forty-eight assessable patients. Five patients had missing data.

‡Forty-three assessable patients.

§Five patients had not been assessed for response.

¶Forty-one assessable patients. Six patients had missing data.

At the last follow-up, 29 patients (35%) had been completely withdrawn from immunosuppressive (IS) medication at a median of 6 months (range, 2 to 49 months) post-SCT. Nineteen (43%) of the 43 surviving patients were free of IS medication at the last follow-up, which was a median of 9 months (range, 3 to 41 months) post-transplantation.

Outcomes

Overall survival. At the last follow-up, 44 patients (47%) were alive. Forty-nine patients died as consequence of the following: relapse or progression of the underlying disease (n = 27; 29%), GVHD (n = 12; 13%), infections (n = 5; 5%), or other toxicities (n = 5; 5%). The 4-year probability of OS was 45% (95% CI, 34% to 56%) for the entire group. OS for patients with AML and MDS were 42% (95% CI, 28% to 56%) and 49% (95% CI, 31% to 76%), respectively (P = .4 Fig 1A). Table 2 lists the variables associated with OS. In univariate analyses, chemotherapy-refractory disease, the presence of greater than 5% blasts in BM at SCT, high-risk cytogenetics, advanced-phase

disease, and the absence of chronic GVHD were related with poorer OS. In multivariate analysis, only the presence of chronic GVHD improved OS (hazard ratio [HR] 6.1; 95% CI, 3.3 to 11.3; P < .001; Table 2; Fig 2).

Relapse and DFS. Thirty-three patients (35%) relapsed at a median of 4 months (range, 0.6 to 49 months) after SCT. The 3-month, 1-year, and 4-year cumulative incidences of relapse were 15% (95% CI, 9% to 25%), 29% (95% CI, 21% to 40%), and 37% (95% CI, 28% to 49%), respectively, for the entire group (Fig 3). The 4-year cumulative incidences for AML and MDS were 44% (95% CI, 32% to 59%) and 25% (95% CI, 14% to 46%), respectively.

In univariate analysis, variables associated with greater relapse risk were chemotherapy-refractory disease, high-risk cytogenetics, the presence of greater than 5% blasts in BM at SCT, and the absence of chronic GVHD. In the multivariate analysis, risk factors were the absence of chronic GVHD (HR, 6.5; 95% CI, 3.1 to 13.8; P < .001) and an advanced disease status (HR, 2.2; 95% CI, 1.1 to 4.4; P = .03; Table 2; Fig 2).

The 4-year probability of DFS for the entire group was 43% (range, 32% to 54%). The DFS rates for AML and MDS were 39% (95% CI, 26% to 52%) and 49% (95% CI, 31% to 67%), respectively (P = .3; Fig 1B). In univariate analysis, the variables associated with poorer DFS were advanced-phase disease, chemotherapy-refractory disease, high-risk cytogenetics, the presence of greater than 5% of blast in BM at SCT, and the absence of chronic GVHD. In the multivariate analysis, the only variables that influenced DFS were the absence of chronic GVHD (HR, 5.3; 95% CI, 2.4 to 13.8; P < .001) and an advanced disease status (HR, 2.6; 95% CI, 1.2 to 5.4; P = .01; Table 2; Fig 2).

Eleven patients (12%) received at least one DLI, and all of them were for disease relapse. The median time from transplantation to DLI was 4.6 months (range, 3 to 43.5 months). Four (36%) of these patients received some type of chemotherapy before DLI. Complete response after DLI was obtained in five patients (42%), and four of these patients were alive and without AML/MDS at the last follow-up (1, 9, 10, and 35 months after DLI, respectively). Two patients received DLI in early relapse (ie, cytogenetic or molecular relapse without hematologic relapse), and both patients achieved CR and maintained CR at last follow-up. All patients who did not respond to DLI died as a result of AML/MDS.

Nonrelapse mortality. Eighteen patients died as a result of non-relapse causes at a median of 4.3 months (range, 0 to 21 months). The 3-month, 12-month, and 4-year cumulative incidences of acute NRM were 8% (95% CI, 4% to 15%), 16% (95% CI, 10% to 26%), and 20% (95% CI, 14% to 32%), respectively. The most frequent causes of NRM were GVHD (n = 13), infections without active GVHD (n = 5), and other toxicities (two episodes of CNS bleeding, one pancreatic adenocarcinoma, and one thromboembolism).

In univariate analyses, variables associated with higher NRM rates were acute GVHD, age older than 60 years, greater than 5% blasts in BM, and the absence of prior chemotherapy. In multivariate analyses, acute GVHD (grades 2 to 4) was the most important variable associated with NRM (HR, 3.7; 95% CI, 1.4 to 13; P = .005), whereas age older than 60 years showed a trend (HR, 2.6; 95% CI, 1 to 6.9; P = .059; Table 2).

Twenty seven (31%) of 86 assessable patients developed at least one CMV infection, and 7 patients (8%) developed CMV disease,

Artículo 2: Valcarcel D, Martino R, Caballero D et al. “Sustained remissions of high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic transplantation: Chronic graft versus host disease is the strongest factor improving survival”

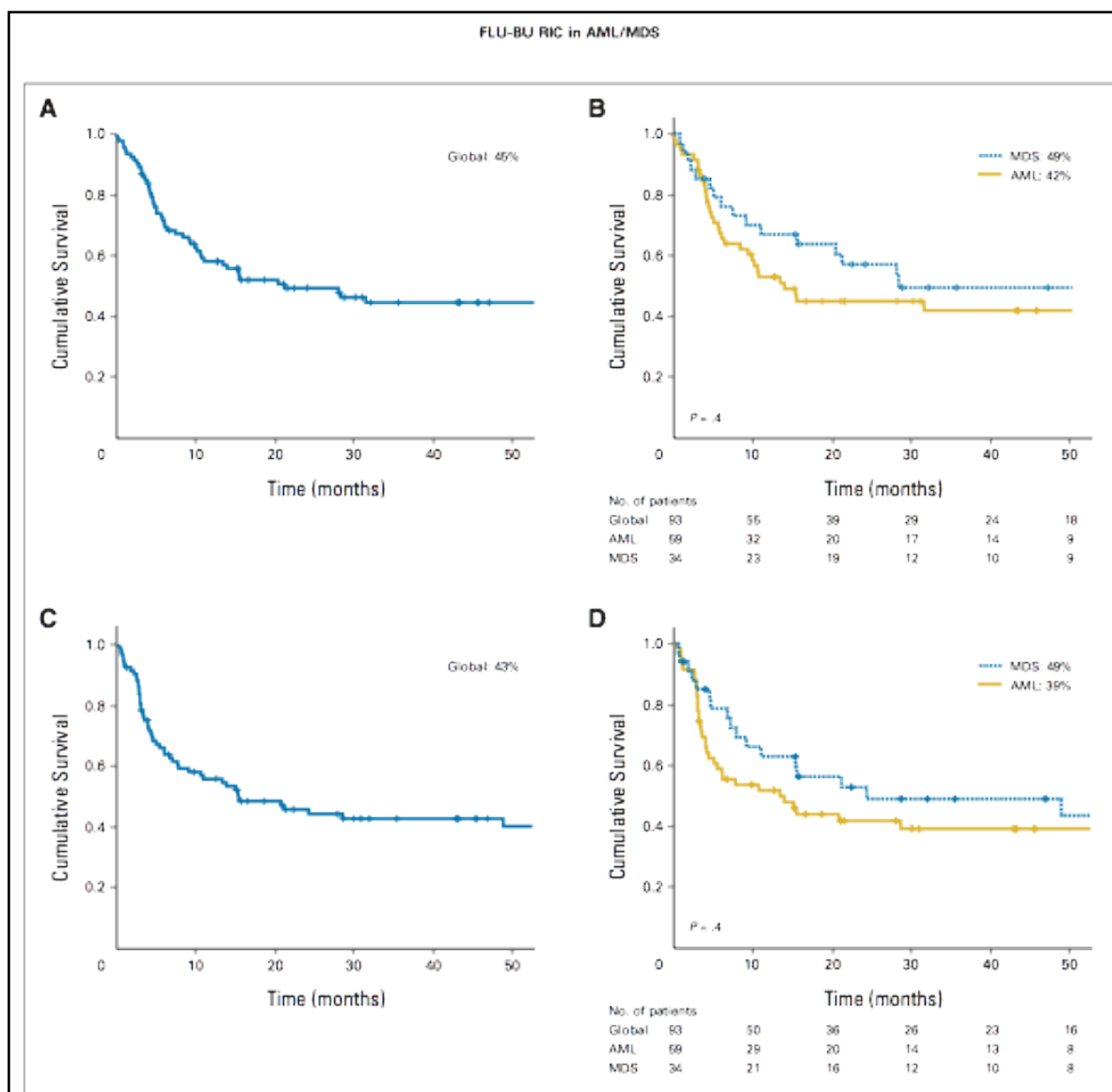


Fig 1. (A and B) Overall and (C and D) disease-free survival. MDS, myelodysplastic syndrome; AML, acute myeloid leukemia.

which occurred in the setting of GVHD in all patients and was the cause of death in three patients (4%).

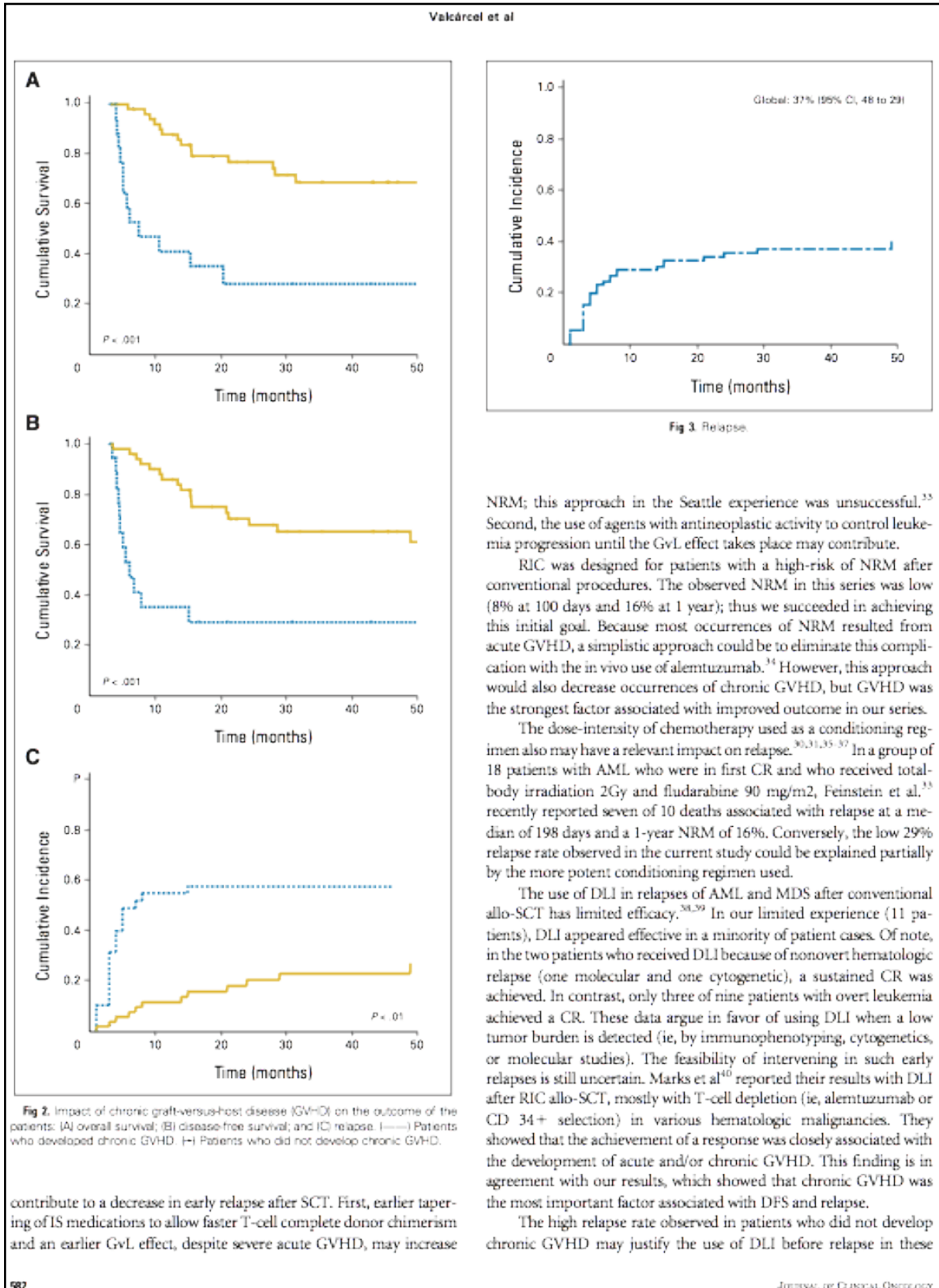
DISCUSSION

In the last 10 years, RIC allo-SCT has been increasingly used for providing the GvL effect to patients ineligible for conventional transplantation. Unfortunately, the GvL effect is closely linked to GVHD, and—so far—it is not possible to separate the two phenomena. The key finding of our study was that the development of chronic GVHD was the strongest variable that protected from relapse. Because chronic GVHD did not significantly increase NRM, this variable was also the

strongest predictor for 4-year OS and DFS. Acute GVHD is also associated with the GvL effect, but in our study it led to an increased NRM and did not provide any benefit in OS or DFS.

In our study, as in most other series about RIC allo-SCT, relapse was the main cause of treatment failure.^{30,31} As in other studies that involved AML and high-risk MDS, most relapses occurred a few months post-transplantation. In our series, a median time to relapse of only 4 months was too short to allow a powerful and sustained GvL effect.^{29,32} The platform for this effect is complete T-cell chimerism, which was observed after 100 days or more in most patients who underwent transplantations. Additionally, most patients who relapsed were still under the influence of IS drugs. Two alternatives may

Artículo 2: Valcarcel D, Martino R, Caballero D et al. "Sustained remissions of high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic transplantation: Chronic graft versus host disease is the strongest factor improving survival"



Artículo 2: Valcarcel D, Martino R, Caballero D et al. "Sustained remissions of high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic transplantation: Chronic graft versus host disease is the strongest factor improving survival"

FLU-BU RIC in AML/MDS

patients. However, because a significant proportion of patients developed severe GVHD after DLI, it is important to adequately select those patients who really need this intervention.

In conclusion, our study lends further support to the use of RIC allo-SCT in patients with AML/MDS who are not appropriate candidates for a standard conditioning regimen. The current study shows that the development of chronic GVHD not only reduces relapse but also improves 4-year survival, which—to the best of our knowledge—has not been reported to date in a large and homogeneous series of patients with AML/MDS who were treated with RIC allo-SCT. Nevertheless, patients with advanced AML and high-risk MDS require novel approaches to reduce early post-transplantation relapses.

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) indicated no potential conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: David Valcárcel, Rodrigo Martino
Provision of study materials or patients: David Valcárcel, Rodrigo Martino, Dolores Caballero, Jesus Martin, Christelle Ferra, Jose B. Nieto, Antonia Sampol, M. Teresa Bernal, Jose L. Piñana, Lourdes Vazquez, Jose M. Ribera, Joan Besalduch, Jose M. Moraleda, Dolores Carrera, M. Salut Brunet, Jose A. Perez-Simón, Jorge Sierra
Collection and assembly of data: David Valcárcel, Rodrigo Martino, Dolores Caballero, Jesus Martin, Christelle Ferra, Jose B. Nieto, Antonia Sampol, M. Teresa Bernal, Jose L. Piñana, Jose M. Ribera, Joan Besalduch, Jose M. Moraleda, Dolores Carrera, Jose A. Perez-Simón, Jorge Sierra
Data analysis and interpretation: David Valcárcel, Rodrigo Martino
Manuscript writing: David Valcárcel, Rodrigo Martino
Final approval of manuscript: David Valcárcel, Rodrigo Martino, Dolores Caballero, Jesus Martin, Christelle Ferra, Jose B. Nieto, Antonia Sampol, M. Teresa Bernal, Jose L. Piñana, Lourdes Vazquez, Jose M. Ribera, Joan Besalduch, Jose M. Moraleda, Dolores Carrera, M. Salut Brunet, Jose A. Perez-Simón, Jorge Sierra

REFERENCES

1. 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* 89:4531-4536, 1997
2. 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* 91:756-763, 1998
3. Valcarcel D, Martino R, Sureda A, et al: Conventional versus reduced-intensity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies. *Eur J Haematol* 74:144-151, 2005
4. Cassileth PA, Harrington DP, Appelbaum FR, et al: Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. *N Engl J Med* 339:1649-1656, 1998
5. Gale RP, Park RE, Dubois RW, et al: Delphi-panel analysis of appropriateness of high-dose therapy and bone marrow transplants in adults with acute myelogenous leukemia in 1st remission. *Leuk Res* 23:709-718, 1999
6. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, et al: Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: A Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 96:4075-4083, 2000
7. Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R, et al: Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia: European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups. *N Engl J Med* 332:217-223, 1995
8. Cahn JY, Labopin M, Mandelli F, et al: Autologous bone marrow transplantation for first remission acute myeloblastic leukemia in patients older than 50 years: A retrospective analysis of the European Bone Marrow Transplant Group. *Blood* 85:575-579, 1995
9. De Witte T, Van BA, Hermans J, et al: Autologous bone marrow transplantation for patients with myelodysplastic syndrome (MDS) or acute myeloid leukemia following MDS: Chronic and Acute Leukemia Working Parties of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 90:3853-3857, 1997
10. Martino R, Caballero MD, Simon JA, et al: Evidence for a graft-versus-leukemia effect after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes. *Blood* 100:2243-2245, 2002
11. Lazarus HM, Rowe JM: Reduced-intensity conditioning for acute myeloid leukemia: Is this strategy correct. *Leukemia* 20:1673-1682, 2006
12. Schmid C, Schleuning M, Ledderose G, Tischer J, Kolb HJ: Sequential regimen of chemotherapy, reduced-intensity conditioning for allogeneic stem-cell transplantation, and prophylactic donor lymphocyte transfusion in high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol* 23:5675-5687, 2005
13. Sayer HG, Kroger M, Beyer J, et al: Reduced intensity conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia: Disease status by marrow blasts is the strongest prognostic factor. *Bone Marrow Transplant* 31:1089-1095, 2003
14. Hallemeier C, Girgis M, Blum W, et al: Outcomes of adults with acute myelogenous leukemia in remission given 550 cGy of single-exposure total body irradiation, cyclophosphamide, and unrelated donor bone marrow transplants. *Biol Blood Marrow Transplant* 10:310-319, 2004
15. Hegenbart U, Niedewieser D, Sandmaier BM, et al: Treatment for acute myelogenous leukemia by low-dose, total-body, irradiation-based conditioning and hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors. *J Clin Oncol* 24:444-453, 2006
16. Claxton DF, Ehmman C, Rybka W: Control of advanced and refractory acute myelogenous leukemia with sirolimus-based non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 130:256-264, 2005
17. Miller KB, Roberts TF, Chan G, et al: A novel reduced intensity regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation associated with a reduced incidence of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 33:881-889, 2004
18. Platzbecker U, Thiede C, Fussel M, et al: Reduced intensity conditioning allows for up-front allogeneic hematopoietic stem cell transplantation after cytoreductive induction therapy in newly diagnosed high-risk acute myeloid leukemia. *Leukemia* 20:707-714, 2006
19. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al: International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89:2079-2088, 1997
20. Gomez-Nunez M, Martino R, Caballero MD, et al: Elderly age and prior autologous transplantation have a deleterious effect on survival following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning: Results from the Spanish multicenter prospective trial. *Bone Marrow Transplant* 33:477-482, 2004
21. Kaplan EL MP: Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53:457-481, 1958
22. Klein JP, Rizzo JD, Zhang MJ, Keiding N: Statistical methods for the analysis and presentation of the results of bone marrow transplants: Part 2—Regression modeling. *Bone Marrow Transplant* 28:1001-1011, 2001
23. Klein JP, Rizzo JD, Zhang MJ, Keiding N: Statistical methods for the analysis and presentation of the results of bone marrow transplants: Part 1—Unadjusted analysis. *Bone Marrow Transplant* 28:909-915, 2001
24. Baron F, Maris MB, Sandmaier BM, et al: Graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol* 23:1993-2003, 2005
25. Appelbaum FR, Pearce SF: Hematopoietic cell transplantation in first complete remission versus early relapse. *Best Pract Res Clin Haematol* 19:333-339, 2006
26. de Lima M, Giral S: Allogeneic transplantation for the elderly patient with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Semin Hematol* 43:107-117, 2006
27. Przepiorcka D, Weisdorf D, Martin P, et al: 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 15:825-828, 1995

Artículo 2: Valcarcel D, Martino R, Caballero D et al. “Sustained remissions of high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic transplantation: Chronic graft versus host disease is the strongest factor improving survival”

28. 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* 11:945-956, 2005

29. Valcarcel D, Martino R, Caballero D, et al: Chimerism analysis following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant* 31:387-392, 2003

30. Martino R, Parody R, Fukuda T, et al: Impact of the intensity of the pretransplantation conditioning regimen in patients with prior invasive aspergillosis undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A retrospective survey of the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 108:2928-2936, 2006

31. Shimoni A, Hardan I, Shem-Tov N, et al: Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in AML and MDS using myeloablative versus reduced-intensity conditioning: The role of dose intensity. *Leukemia* 20:322-328, 2006

32. Childs R, Clave E, Contentin N, et al: Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: Full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood* 94:3234-3241, 1999

33. Feinstein LC, Sandmaier BM, Hegenbart U, et al: Non-myeloablative allografting from human leukocyte antigen-identical sibling donors for treatment of acute myeloid leukaemia in first complete remission. *Br J Haematol* 120:281-288, 2003

34. Ho AY, Pagliuca A, Kanyon M, et al: 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, 2004

35. Andersson BS, Thall PF, Madden T, et al: Busulfan systemic exposure relative to regimen-related toxicity and acute graft-versus-host disease: Defining a therapeutic window for i.v. BuCy2 in chronic myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 8:477-485, 2002

36. Clift RA, Buckner CD, Appelbaum FR, et al: Allogeneic marrow transplantation in patients with

acute myeloid leukemia in first remission: A randomized trial of two irradiation regimens. *Blood* 76:1867-1871, 1990

37. de Lima M, Anagnostopoulos A, Munsell M, et al: 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* 104:865-872, 2004

38. Porter D, Levine JE: Graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia after donor leukocyte infusion. *Semin Hematol* 43:53-61, 2006

39. Levine JE, Braun T, Penza SL, et al: Prospective trial of chemotherapy and donor leukocyte infusions for relapse of advanced myeloid malignancies after allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 20:405-412, 2002

40. Marks DI, Lush R, Cavenagh J, et al: The toxicity and efficacy of donor lymphocyte infusions given after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 100:3108-3114, 2002



Objetivo 3: Análisis de la mortalidad relacionada con el tratamiento en pacientes con LMA y SMD de alto riesgo. Comparación entre el Alo-TIR y el Alo-Conv con selección positiva de células CD 34+ en pacientes que reciben un trasplante de donante familiar HLA idéntico.

Resumen:

En este trabajo se compararon dos estrategias destinadas a reducir la mortalidad relacionada con el trasplante en pacientes que recibieron un trasplante alogénico por leucemia aguda mieloide o síndrome mielodisplásico en primera remisión o sin tratamiento previo. El tipo de acondicionamiento se decidió en función de la edad: los pacientes menores de 50 años recibieron un acondicionamiento convencional (Alo-Conv) con ciclofosfamida e irradiación corporal total y uso selección positiva de CD34+ (n=40) (Alo-CD34+) mientras que los mayores de esa edad recibieron un acondicionamiento de intensidad reducida (Alo-TIR) con fludarabina y dosis reducidas de busulfán (n=47).

El 88% del grupo Alo-CD34+ y el 83% del grupo Alo-TIR llegó a recibir el tratamiento asignado. Con una edad mediana de 44 años, la mortalidad asociada con el procedimiento a los 4 años fue del 19% y del 20% para los grupos Alo-CD34+ y Alo-TIR, respectivamente (P=0.8) La incidencia de recidiva (21% en ambos grupos, P=0.9) la supervivencia global (60% vs 59%, P=0.8) y supervivencia libre de enfermedad (60% vs 59%, P=0.8) no resultaron diferentes entre ambos grupos.

Este trabajo indicó que la elevada mortalidad asociada con el trasplante en pacientes de edad avanzada se pudo controlar con el acondicionamiento de intensidad reducida.

Justificación

Una vez comprobada tanto la aplicabilidad del procedimiento como su capacidad para obtener remisiones a largo plazo y potencialmente curar a pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) y síndrome mielodisplásico (SMD) de alto riesgo, el siguiente paso fue comparar dos estrategias cuya intención fue reducir la mortalidad relacionada con el tratamiento (MRT): EL trasplante alogénico (Alo-TPH) con acondicionamiento de intensidad reducida (Alo-TIR) y el trasplante alogénico

Objetivo 3: Comparación Alo-CONV CD34+ vs Alo-TIR en LMA o SMD.

convencional con selección positiva de células CD34 (Alo-CD34+) que se había demostrado capaz de reducir la EICR y con ello reducir la MRT. Para ello comparamos pacientes trasplantados de forma prácticamente simultánea en nuestro centro, para evitar el factor centro como variable que pudiera influir en los resultados.

Pacientes y métodos

En este trabajo se incluyeron todos los pacientes con LMA y SMD que recibieron un Alo-TPH de hermano HLA idéntico en nuestro centro entre el año 1998 y 2005. Se utilizó el término fase precoz de la enfermedad de acuerdo a los criterios previamente establecidos y comúnmente utilizados en el contexto del trasplante. Específicamente, se incluyeron en esta categoría los pacientes con LMA o SMD en RC tras la quimioterapia de inducción y los pacientes con SMD que no habían recibido ningún tratamiento previo al trasplante. La edad sirvió para indicar el tipo de trasplante, de forma que los pacientes con edad superior a 50 años recibieron un Alo-TIR (n=47) mientras que los más jóvenes recibieron un acondicionamiento convencional y un trasplante con selección CD34+ (n=40). Sin embargo, 8 de los pacientes de edad superior a 50 años (17%) y 5 (13%) de los más jóvenes de 50 años no recibieron el trasplante tal y como estaba previsto debido a progresión de la enfermedad de base (n=10) o muerte durante la intensificación (n=3); por lo tanto, el número de pacientes incluidos finalmente fue de 39 en el grupo Alo-TIR y 35 en el grupo de selección positiva de CD34+.

Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado que había sido previamente aprobado por el comité de ética local y las autoridades sanitarias pertinentes.

Las características de los pacientes están detalladas en la **tabla 16**.

Los esquemas de acondicionamiento usados fueron homogéneos en cada uno de los grupos de edad. En el grupo Alo-TIR se utilizó el mismo esquema ya descrito previamente con fludarabina en dosis total de 150 mg/m² y busulfán en dosis total de 10 mg/kg, mientras que en el grupo Alo-CD34+ se utilizó ciclofosfamida en dosis total de 120 mg/kg (repartida en los días -6 y -5) e irradiación corporal total en dosis de 13 Gy (administrada en dos sesiones diarias durante los días -3, -2 y -1). La

Objetivo 3: Comparación Alo-CONV CD34+ vs Alo-TIR en LMA o SMD.

profilaxis de EICR se basó en ambos grupos en ciclosporina A, que en el grupo Alo-TIR se combinó con un ciclo corto de metotrexate.

Tabla 16: Características de los pacientes.

| | Alo-CD34+ (N=40) | INTENSIDAD REDUCIDA (N=47) | P |
|---|---------------------|----------------------------------|------|
| Pacientes que realizaron el tratamiento asignado | 35 (88%) | 39 (83%) | |
| Edad: mediana (rango), años | 42 (19-50) | 59 (51-69) | NT |
| Donante mujer-Paciente Varón | 7 (20) | 11 (28) | NS |
| Diagnóstico. N(%) Leucemia Mieloblástica Síndrome mielodisplásico | 33 (94) 2 (6) | 22 (56) 17 (44) | 0.01 |
| Blastos, mediana (rango) | 1 (0.1-5%) | 1 (0.5-6%) | NS |
| Citogenética de alto riesgo, N (%) | 15 (43) | 28 (72) | |
| Índice de comorbilidad (≥ 3), N (%) | 9 (26) | 18 (46) | 2 |

NT: No testado; NS: No significación estadística;

Consideraciones estadísticas

Las características biológicas de la LMA y los SMD en grupos no seleccionados de diferente edad se espera que sean diferentes, y estas diferencias biológicas tienen impacto en la probabilidad de recidiva y en la supervivencia libre de progresión, Por otra parte, la MRT está íntimamente ligada a edad. Por todo ello en este estudio se estudiaron los resultados tanto en la población global como en diferentes subgrupos.

La MRT y la recidiva se consideraron eventos competitivos y se analizaron mediante incidencia acumulada y para estimar las diferencias se aplicó el análisis univariado de Cox. Aquellos factores que mostraron un valor de P igual o inferior a 0.1 en el análisis univariado se incluyeron en el análisis multivariado. Las probabilidades de SG y SLP se estimaron mediante el método de Kaplan y Meier. Los factores estudiados en cada una de estas variables fueron: Índice de de comorbilidad, grupo de riesgo citogenético, edad, dosis de CD34, disparidad de

Objetivo 3: Comparación Alo-CONV CD34+ vs Alo-TIR en LMA o SMD.

sexo entre donante y receptor, origen de la enfermedad de base (primario vs. relacionado con terapia previa) y estado serológico de CMV.

Resultados

Injerto hematopoyético y enfermedad injerto contra receptor

Todos los pacientes tuvieron injerto hematopoyético de las células del donante. El tiempo de neutropenia inferior a $0.5 \times 10^9/L$ fue menor en el grupo Alo-TIR vs. Alo-CD34+ (8 vs. 15 días, $P=0.05$). También fue más breve el tiempo de trombopenia inferior a $20 \times 10^9/L$ en el grupo Alo-TIR vs. Alo-CD34+ (4 vs. 14; $P=0.05$). La obtención de quimerismo completo en linfocitos T fue más rápido en el grupo Alo-TIR que en el grupo de selección CD34+, como se demuestra por un mayor porcentaje de pacientes en quimera completa en los días +90, +180 y +360 (**tabla 17**).

La incidencia de EICR aguda grado II-IV fue similar en ambos grupos, con una incidencia acumulada en el grupo de Alo-TIR del 21% (IC 95%:14-28%) y del 18% (IC 95%: 6-30%) en el grupo Alo-CD34+ ($P=0.8$). Sin embargo la incidencia de EICR crónica fue claramente superior en el grupo de Alo-TIR (71% IC 95%: 56-86%) que en el grupo Alo-CD34+ (32%, IC:95% 15-49%), ($P<0.01$).

Tabla 17: Estudio comparativo de adquisición de quimerismo completo.

| | Alo-CD34+ (N=40) | Alo-TIR (N=47) |
|--|---------------------|-------------------|
| Quimerismo completo en células no fraccionadas (% pacientes) | | |
| día +30 | 90 | 80 |
| día +90 | 100 | 95 |
| días +180 a +360 | 100 | 100 |
| Quimerismo completo en Linfocitos T (% pacientes) | | |
| día +30 | 20 | 20 |
| día +90 | 40 | 60 |
| días +180 a +360 | 55 | 100 |
| Quimerismo completo en granulocitos (% pacientes) | | |
| día +30 | 90 | 80 |
| día +90 | 100 | 95 |
| días +180 a +360 | 100 | 100 |

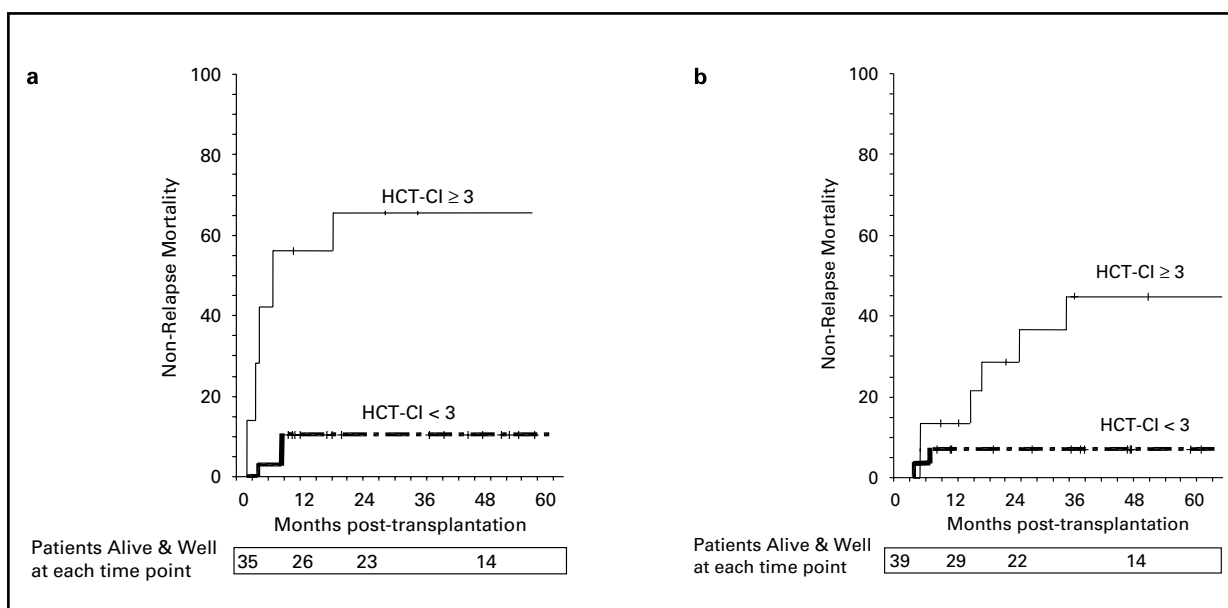
Mortalidad relacionada con el trasplante y EICR

El seguimiento mediano de los pacientes vivos fue de 4 años. El tipo de trasplante (Alo-TIR vs selección CD34+) no tuvo impacto en ninguna de las variables analizadas en el post-trasplante a 4 años. La **tabla 18** muestra los datos de SG, SLP y recidiva tanto para la población global como por intención de tratamiento. En el análisis multivariado de recidiva solamente la ausencia de EICR crónica se asoció a mayor riesgo de recidiva de la enfermedad (HR 5.8, IC 95% 1.6-24, P=0.04).

Tabla 18: Estudio de las variables post-trasplante.

| | Alo-CD34+ (N=40) | Alo-TIR (N=47) | P |
|-------------------------------|---------------------|-------------------|-----|
| SLP a 4 años, % (IC 95%) | | | |
| Por intención de tratamiento | 60 (41-79) | 59 (42-78) | 0.8 |
| | 50 (31-69) | 43 (30-66) | 0.9 |
| SG a 4 años, % (IC 95%) | | | |
| Por intención de tratamiento | 59 (39-77) | 60 (41-79) | 0.9 |
| | 52 (32-70) | 49 (29-67) | 0.8 |
| Recidiva a 4 años, % (IC 95%) | 21 (6-42) | 21 (7-41) | 0.8 |

Figura 6: Impacto del índice de comorbilidad de trasplante en la mortalidad asociada al trasplante.



a: Impacto del índice de comorbilidad en pacientes que recibieron un trasplante con selección de células CD34+. b: Pacientes que recibieron un trasplante con acondicionamiento de intensidad reducida

La incidencia acumulada de MRT a 4 años fue del 20% (IC 95%: 11-37%) en el grupo de Alo-TIR y del 19% (IC 95%: 9-37) en el grupo de Alo-CD34+ (P NS). Los factores relacionados con una mayor MRT en los análisis univariado y multivariado se muestran en la **tabla 19**. Los análisis univariados se realizaron en la población global y también en cada uno de los grupos de trasplante, mientras que el multivariado solo se pudo realizar para la población global y no para los subgrupos debido al reducido número de pacientes en cada grupo. El índice de comorbilidad demostró tener un gran impacto en ambos grupos de pacientes, como se ilustra en la **figura 6**.

En el análisis multivariado de recidiva, solamente la EICR crónica tuvo impacto significativo, con una incidencia de recidiva del 10% en los pacientes que presentaron EICR crónica vs. el 38% en los que no la desarrollaron (HR 5.8, IC 95%: 1.6-24; P=0.04). En cuanto al análisis multivariado de la SG y la SLP, los factores con influencia adversa fueron no desarrollar EICR crónica (HR: 3.6, IC 95%: 1.2-20; P=0.02, para SG y HR: 5.3, IC 95%: 1.2-29; P=0.02 para SLP) y un

Objetivo 3: Comparación Alo-CONV CD34+ vs Alo-TIR en LMA o SMD.

elevado índice de comorbilidad, con una P de 0.05 para supervivencia global y de 0.06 para SLP.

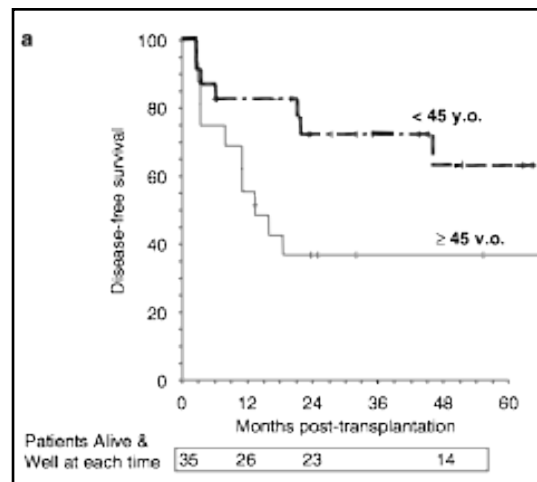
Tabla 19: Factores relacionados con la mortalidad relacionada con el tratamiento

| | Análisis Global | | Alo-CD34+ | | Alo-TIR | |
|--|-------------------------|-------------------------|---------------------|----------|---------------------|----------|
| | Inc Acum a 4 años % | HR (IC 95%) P multivar | Inc Acum a 4 años % | P unilat | Inc Acum a 4 años % | P unilat |
| Tipo de trasplante Alo-CD34+ Alo-TIR | 19 (9-37) 20 (11-37) | 0.8(--) nd | ----- | | ----- | |
| Edad paciente < mediana > mediana | 16 22 | nd | 12 31 | 0.01 | 17 20 | 0.7 |
| Dif de sexo don/re Do mujer/Re hombre Otras | 54 4 | 8.3 (2-34) 0.001 | 40 8 | 0.01 | 38 5 | 0.01 |
| Índice de comorbilidad TPH 0 1-2 >2 | 6 14 49 | 9.8 (1.1-39) 0.05 | 3 19 65 | 0.01 | 6 10 45 | 0.04 |
| Células CD 34 inf < mediana > mediana | 20 18 | NA | 16 20 | 0.9 | 33 7 | 0.01 |
| EICR aguda 2-4 Si No | 35 10 | NA, 0.2 | 36 10 | 0.09 | 28 12 | 0.3 |

Alo-CD34: Trasplante con selección positiva CD 34, Alo-TIR: Alotrasplante de intensidad reducida; Do: Donante; Re: Receptor; inf: Infundidas; EICR: Enfermedad injerto contra receptor; Inc Axum: Incidencia acumulada; IC 95%: Intervalo de confianza del 95%; Multivar: Análisis Multivariado; Univar: Análisis Univariado

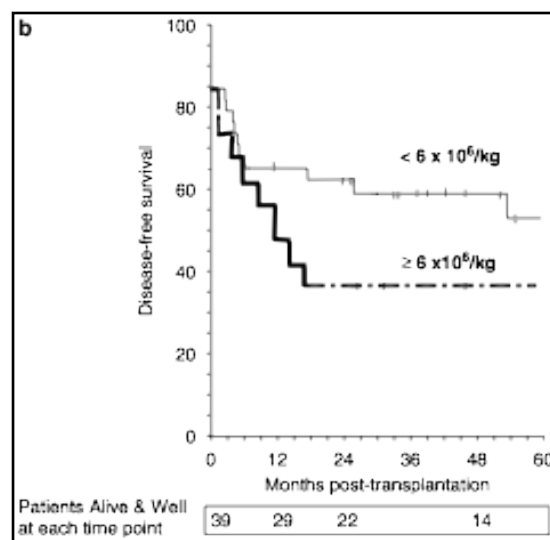
En cuanto al análisis de subgrupos, hubo dos factores cuya influencia fue diferente en el grupo de pacientes Alo-TIR y en el grupo de selección positiva CD34. Una edad superior a 42 años tuvo impacto negativo sobre la SG, SLP y MRT en el grupo de Alo-CD34+ pero no influyó en el grupo de Alo-TIR (**figura 7**).

Figura 7: Impacto de la edad en pacientes que recibieron un trasplante con selección positiva de células CD34+.



La celularidad infundida se demostró importante en el trasplante de intensidad reducida ya que la infusión de células CD34 en cantidad superior a $6 \times 10^6/\text{Kg}$ demostró estar relacionada con una peor SG en el grupo de pacientes Alo-TIR (figura 8).

Figura 8: Impacto de la celularidad infundida en pacientes que recibieron un trasplante con acondicionamiento de intensidad reducida.



Por otra parte y de acuerdo con observaciones previas, la toxicidad extra-hematológica en la fase precoz post-trasplante (primeros 30 días tras el trasplante) en el grupo Alo-RIC fue moderada, lo que se tradujo en en menor duración de la estancia hospitalaria. En contraste, el número de ingresos entre el día +30 y hasta

Objetivo 3: Comparación Alo-CONV CD34+ vs Alo-TIR en LMA o SMD.

un año post-trasplante fue superior en el grupo de Alo-TIR (mediana 3, rango 0-6) que en el grupo de selección positiva (mediana 1, rango 0-4) (P=0.05), debido sobre todo a infecciones y a EICR gastrointestinal.

Finalmente, el porcentaje de pacientes con un índice de Karnofsky igual o superior al 90% fue superior en el grupo Alo-CD34+ que en el grupo Alo-TIR como se refleja en la **tabla 20**.

Tabla 20: Porcentaje de pacientes con un índice de Karnofsky superior al 90%.

| | Selección CD34+ (N=40) | INTENSIDAD REDUCIDA (N=47) |
|--------|---------------------------|-------------------------------|
| 1 año | 50% | 30% |
| 2 años | 75% | 40% |
| 4 años | 90% | 60% |

Los resultados de esta parte del trabajo fueron publicados en forma de artículo en la revista Bone Marrow Transplantation, a continuación se aporta una copia del trabajo tal y como fue publicado.

Artículo 3: Martino R, Valcarcel D, Brunet S et al “Comparable non-relapse mortality and survival after HLA-identical sibling blood stem cell transplantation with reduced or conventional-intensity preparative regimens for high-risk myelodysplasia or acute myeloid leukemia in first remission”

Bone Marrow Transplantation (2008) 41, 33–38
& 2008 Nature Publishing Group. All rights reserved 0268-3369/08 \$30.00
www.nature.com/bmt



ORIGINAL ARTICLE

Comparable non-relapse mortality and survival after HLA-identical sibling blood stem cell transplantation with reduced or conventional-intensity preparative regimens for high-risk myelodysplasia or acute myeloid leukemia in first remission

R Martino, D Valcárcel, S Brunet, A Sureda and J Sierra

Division of Clinical Hematology, Hospital de la Sant Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

We prospectively compared two strategies of allogeneic PBSCT from HLA-identical siblings in adults with poor-risk AML or myelodysplastic syndrome with 4–5% marrow blasts in an early disease status (AML or refractory anemia with excess blasts (RAEB type 2) in first remission after chemotherapy or untreated RAEB type 1). Based only on age, all consecutive patients were offered one of two specific transplant protocols. Patients \geq 50 years old received conventional high-dose conditioning with cyclophosphamide-TBI and use of CD34 β -selected PBSCT (CTCD34 β group), while patients aged 4–50 years received a reduced-intensity conditioning (RIC) with fludarabine and oral busulphan (FB-RIC). Seventy-five patients entered the study (35 in the CTCD34 β and 39 in the FB-RIC group). The median follow-up was 4.4 years in both groups. The 4-year non-relapse mortality (NRM) was 19 and 20%, respectively ($P=0.8$). Relapse and survival were also equivalent in both groups. These results suggest that in this setting, the expected high NRM in elderly patients can be reduced with an RIC regimen.

Bone Marrow Transplantation (2008) 41, 33–38;
doi:10.1038/sj.bmt.1705879; published online 5 November 2007
Keywords: conditioning regimens; allogeneic transplantation; AML; myelodysplastic syndromes

Introduction

Conventional high-dose TBI-containing conditioning regimens for allogeneic hematopoietic SCT (alloHSCT) have a high non-relapse mortality (NRM) in adults with high-risk myelodysplastic syndromes (MDS) and AML above the age of 45–50 years.^{1–3} In an effort to reduce NRM, several

groups have developed reduced-intensity conditioning (RIC) regimens,^{4–11} which lead to engraftment of donor lymphoid and hematopoietic stem cells without the non-hematologic toxicities of traditional myeloablative transplants.^{4–13} However, experience with RIC alloHSCT in AML and high-risk MDS is limited. We have reported previously that RIC followed by allogeneic PBSCT after a homogeneous RIC regimen produces high rates of engraftment with tolerable toxicity and acceptable outcomes in a heterogeneous group of patients with myeloid malignancies.^{12,13} On the basis of these data, we started a prospective trial in which adult patients with poor-risk AML and MDS in an early disease status and with an HLA-identical sibling were assigned to receive a conventional or an RIC regimen based solely on patient age. The outcomes of both conditioning strategies, with a specific emphasis on NRM, were compared in the 74 adults who received the assigned conditioning strategy, as well as in all patients with an HLA-identical sibling on the basis of intention to treat (ITT).¹⁴

Patients and methods

Patient selection

Between 1998 and December 2005, all consecutive adult patients with ‘poor-prognosis’ AML or MDS in an ‘early disease’ status and with an HLA-identical sibling were programmed to receive an allogeneic PBSCT within this study. Early disease status was defined as AML or refractory anemia with excess blast (RAEB) type 2 (blasts in BM at diagnosis \geq 10%) in CR-1 after chemotherapy¹⁵ and untreated RAEB type 1.

‘Poor-prognosis’ AML and RAEB type 2 were defined as one or more of the following: (1) poor-risk cytogenetics;¹⁴ (2) CR-1 was obtained only after two cycles of intensive induction therapy; and/or (3) presence of *flt-3* internal tandem duplication or *MLL* rearrangement in molecular analysis.¹⁶ Poor-prognosis RAEB type 1 was defined by an international prognostic score intermediate-2 or high.¹⁷


During the study period, 40 consecutive patients 50 years of age or younger were assigned to receive the conventional

Correspondence: Dr R Martino, Division of Clinical Hematology, Servei d’Hematologia Clínica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Av. Sant Antoni Maria Claret, 167, Barcelona 08025, Spain.

E-mail: rmartino@santpau.es

Received 25 January 2007; revised 10 July 2007; accepted 29 August 2007; published online 5 November 2007

Artículo 3: Martino R, Valcarcel D, Brunet S et al “Comparable non-relapse mortality and survival after HLA-identical sibling blood stem cell transplantation with reduced or conventional-intensity preparative regimens for high-risk myelodysplasia or acute myeloid leukemia in first remission”



34

Comparison of conditioning regimens in AML/MDS
R Martino et al

high-dose conditioning regimen, while 47 patients above the age of 50 were assigned to receive the RIC regimen. However, five (13%) and eight (17%) patients from each transplant group, respectively, did not reach the assigned therapy because of disease progression (n¼10) or death during intensification chemotherapy (n¼3). Thus, the number of patients who received the assigned therapy was 35 and 39, respectively. Patients gave written informed consent for inclusion in the protocols, which were approved by all local ethical review boards and the Spanish Drug Agency. The characteristics and outcomes of the 74 study subjects are shown in Table 1.

Conditioning regimens and supportive care
A homogeneous transplant protocol was used in each study (or age) group. Young patients (those with 50 years of age or younger) were conditioned with cyclophosphamide plus

Table 1 Patient characteristics and transplant outcomes (% in parentheses)

| | CTCD34+ group | FB-RIC group | P |
|--|-----------------------|-----------------------|--------|
| Patients assigned to a study group ^a | 40 | 47 | |
| Patient and transplant characteristics (patients who reached the assigned transplant group) ^b | 35 (88%) ^b | 39 (83%) ^b | |
| Age, median (range) | 42 (19–50) | 59 (51–69) | NT |
| Patient male-donor female | 7 (20) | 11 (28) | NS |
| Underlying disease | | | |
| Acute myelogenous leukemia | 33 (94) | 22 (56) | o 0.01 |
| Refractory anemia with excess blasts (types 1 and 2) | 2 (6) | 17 (44) | |
| Median BM blasts at transplantation ^c (range) | 1 (o 0.1–5%) | 1 (0.5–6%) | NS |
| Poor-risk cytogenetics ^d | 15 (43) | 28 (72) | 0.03 |
| High hematopoietic cell transplantation-comorbidity index (X 3) ^e | 9 (26) | 18 (46) | 0.002 |
| Do or Re CMV seropositive | 32 (91) | 36 (92) | NS |
| Major post transplant outcomes | | | |
| Median days to neutrophil count 4 0.5 × 10 ⁹ /l (range) | 13 (10–28) | 15 (9–21) | NS |
| Median days of early inpatient care (range) ^f | 20 (14–30) | 9 (0–18) | o 0.02 |
| CDC in UF nucleated cells from PB (subset CDC in T cells/granulocytes) ^g | | | |
| Day + 30 | 90 (20/90) | 80 (20/80) | NS |
| Day + 90 | 100 (40/100) | 95 (60/95) | |
| Days + 180 to + 360 | 100 (55/100) | 100 (100/100) | |
| Developed grade II–IV aGVHD (% CumInc, 95% CI) ^h | 6 (18%, 6–30) | 8 (21%, 14–28) | NS |
| Developed cGVHD (% CumInc, 95% CI) ^h | 12 (32%, 15–49) | 20 (71%, 56–86) | o 0.01 |
| % CumInc extensive cGVHD | 20% | 46% | 0.04 |
| Final m-sGVHD (% CumInc, 95% CI) ^h | 13 (32%, 21–43) | 23 (51%, 39–62) | 0.056 |
| Relapse at 4 years (% CumInc, 95% CI) | 21 (6–42) | 21 (7–41) | 0.8 |
| Disease-free survival at 4 years (% probability, 95% CI) | 60 (41–79) | 59 (42–78) | 0.9 |
| Disease-free survival as ITT (% probability, 95% CI) ⁱ | 50 (31–69) | 43 (30–66) | 0.7 |
| Overall survival at 4 years (% probability, 95% CI) | 59 (39–77) | 60 (41–79) | 0.9 |
| Overall survival as ITT (% probability, 95% CI) ⁱ | 52 (32–70) | 49 (29–67) | 0.8 |
| 4-year mortality post transplant | 15 (43) | 15 (38) | |
| GVHD ^h infections | 7 | 7 | |
| Other causes of non-relapse mortality | 1 | — | |
| Disease relapse | 7 | 8 | |
| Median months follow-up in survivors (range) | 52 (12–91) | 50 (13–85) | NS |

Abbreviations: aGVHD ¼ acute GVHD; CDC ¼ complete donor chimerism; cGVHD ¼ chronic GVHD; CI ¼ confidence interval; CTCD34+ ¼ high-dose myeloablative conditioning with cyclophosphamide (120 mg/kg) plus TBI (13.5 Gy) and CD34+ -positive cell selection;^{15,16} CumInc ¼ cumulative incidence; DFS ¼ disease-free survival; Do ¼ Donor; ECOG ¼ Eastern Cooperative Oncology Group; FB-RIC ¼ oral busulphan (10 mg/kg) and fludarabine (150 mg/m²) reduced-intensity conditioning;^{17,18} IPSS ¼ international prognostic scoring system;¹⁹ ITT ¼ intention to treat; m-sGVHD ¼ moderate-to-severe GVHD; MDS ¼ myelodysplastic syndrome; NT ¼ not tested; Re ¼ recipient; UF ¼ unfractionated.

^aRefers to all patients who had an HLA-identical sibling and were assigned to receive one of the two transplant strategies according to their age (i.e., intention-to-treat analysis).

^bThe % in parentheses refers to patients with a compatible sibling donor who actually received the assigned allogeneic HSCT. All other % shown in brackets in the table refer to patients who were actually transplanted.

^cThe % of BM blasts was analyzed by multiparameter flow cytometry.¹⁶

^dCytogenetics were classified using the EORTC/GIMEMA criteria.¹⁴

^eThe HCT-comorbidity index was calculated as described by Sorror et al.²⁰

^fDays required of in-patient supportive care in the early post transplantation period (p day + 30).

^gData on CDC in peripheral blood nucleated cells refers to the finding of 100% donor cells in unfractionated (UF) nucleated cells in patients who were alive and without disease progression at each given time point shown, and without prior donor lymphocyte infusions. In brackets, the CDC in fractionated T lymphocytes and granulocytes from the same PB samples are shown.

^hRefers to GVHD that occurred spontaneously, i.e., without prior donor lymphocyte infusions.

ⁱIn the ITT analysis, DFS and OS were calculated for all patients with a donor (n¼87 patients) and in an early disease status from the moment an HLA-identical sibling was identified. At last follow-up, 2/5 patients in CTCD34+ group (age p 50 years) and 2/8 patients in the FB-RIC group (4–50 years) who did not receive the assigned alloHSCT strategy per protocol were alive and disease-free.

Bone Marrow Transplantation

Artículo 3: Martino R, Valcarcel D, Brunet S et al “Comparable non-relapse mortality and survival after HLA-identical sibling blood stem cell transplantation with reduced or conventional-intensity preparative regimens for high-risk myelodysplasia or acute myeloid leukemia in first remission”

TBI, and PBSC underwent CD34⁺-positive cell selection^{15,18} (CTCD34⁺ transplant group), while the RIC regimen used in elderly patients (more than 50 years of age) consisted of fludarabine plus busulphan^{12,13} (10 mg/kg) (FB-RIC transplant group). GVHD prophylaxis consisted of cyclosporine A alone or in combination with short-course methotrexate in each group, respectively.

Statistical analysis

The biological features of unselected groups of young and elderly patients with AML and high-risk MDS are expected to differ, especially since all consecutive patients were included. These biological differences have an impact on the risk of relapse and disease-free survival (DFS), which may not be apparent in small patient subgroups, and a detailed statistical risk factor analysis for these outcomes would be unreliable. NRM, however, is strongly linked to age. Consequently, the current analysis focuses on NRM in each transplant group as well as in the entire cohort.

Non-relapse mortality and disease relapse were calculated using cumulative incidence estimates. Univariate Cox regression was used for univariate analyses, and variables with a P < 0.1 were included in multivariate Cox regression analyses, while the probabilities of DFS and overall

survival (OS) were estimated using Kaplan–Meier product-limit estimates. Variables analyzed for their impact on outcomes included the hematopoietic cell transplant (HCT)-comorbidity index, cytogenetics risk group, disease type (AML and RAEB type 2 or RAEB type 1), acute GVHD 2–4, chronic GVHD, patient age, CD34⁺ cell dose infused, sex mismatch, origin of AML-MDS (de novo vs therapy-related AML-MDS vs secondary AML) and patient’s CMV serostatus.

All outcomes were measured from the date of transplantation, except for the ITT analysis, which was done from the date that a patient who fulfilled the criteria for an alloHCT was found to have an HLA-identical sibling donor.^{19,21}

Results

All patients had initial donor-derived hematological recovery. The number of days with neutrophils below $0.5 \times 10^9/l$ and platelets below $20 \times 10^9/l$ were shorter in the FB-RIC with respect to the CTCD34⁺ group (15 vs 8 days for neutrophils and 14 vs 4 days for platelets, respectively; P < 0.05 for both comparisons). Using DNA-based chimer-

Table 2 Summary of the results of risk factor analyses for non-relapse mortality

| | Overall analysis ^a | | | CTCD34 ⁺ group ^a | | FB-RIC group ^a | |
|--|-------------------------------|---------------|----------------|--|--------------|---------------------------|--------------|
| | 4-year CumInc | HR (95% CI) | Multivariate P | 4-year CumInc | Univariate P | 4-year CumInc | Univariate P |
| Patients who received the alloHCT (95% CI) | | | | | | | |
| CTCD34 ⁺ conventional conditioning (n ¼ 35) | 19 (9–37) | | | — | — | — | — |
| FB-RIC (n ¼ 39) | 20 (11–37) | 0.8 | NA | — | — | — | — |
| Patient age ^b | | | | | | | |
| Below the median age in each group | 16 | NA | — | 12 | o 0.01 | 17 | 0.7 |
| Above the median age in each group | 22 | | | 31 | | 20 | |
| Sex mismatch | | | | | | | |
| Female Do/male Re | 54 | 8.3 (2–34) | o 0.01 | 40 | o 0.01 | 38 | 0.01 |
| Other combinations | 4 | | | 8 | | 5 | |
| HCT-comorbidity index ^c | | | | | | | |
| 0 | 6 | | | 3 | | 6 | |
| 1–2 | 14 | 9.8 (1.01–39) | 0.05 | 19 | 0.01 | 10 | 0.04 |
| X 3 | 49 | | | 65 | | 45 | |
| CD34 ⁺ cell dose/kg infused ^b | | | | | | | |
| Below the median in each group | 20 | NA | — | 16 | 0.9 | 33 | o 0.01 |
| Above the median in each group | 18 | | | 20 | | 7 | |
| Acute GVHD 2–4 ^d | | | | | | | |
| Yes | 35 | NA | 0.2 | 36 | | 28 | 0.3 |
| No | 10 | | | 10 | 0.09 | 12 | |

Abbreviations: CI ¼ confidence interval; CTCD34⁺ ¼ high-dose myeloablative conditioning with cyclophosphamide (120 mg/kg) plus TBI (13.5 Gy) and CD34⁺-positive cell selection;^{15,18} CumInc ¼ cumulative incidence; Do ¼ Donor; FB-RIC ¼ oral busulphan (10 mg/kg) and fludarabine (150 mg/m²) reduced-intensity conditioning;^{12,13} HCT ¼ hematopoietic cell transplantation; HR ¼ hazard ratio; NA ¼ not applicable; the hazard ratio was not calculated since the variable had no impact in univariate or multivariate analysis; Re ¼ recipient.

^aMultivariate analysis was done in the whole patient population, while only univariate analyses were done separately in each transplant group, due to the small sample sizes.

^bPatient age and dose of CD34⁺ cells/kg infused were divided in two categories: above and below the median value in each group analyzed (53 years old (y.o.) in all 72 patients, 42 y.o. in the CTCD34⁺ group and 59 y.o. in the FB-RIC group).

^cThe HCT-comorbidity index was calculated as described by Sorror et al.²² The P-values and hazard ratios refer to the comparison of an index of 0–2 vs X 3.

^dAnalyzed as a time-dependent covariate.

Artículo 3: Martino R, Valcarcel D, Brunet S et al “Comparable non-relapse mortality and survival after HLA-identical sibling blood stem cell transplantation with reduced or conventional-intensity preparative regimens for high-risk myelodysplasia or acute myeloid leukemia in first remission”

36

Comparison of conditioning regimens in AML/MDS
R. Martino et al

ism testing in peripheral blood,²² the proportion of patients who had complete donor chimerism in T cells on days +90, +180 and +360 was higher in the FB-RIC group (Table 1).

The day +100 cumulative incidence of acute GVHD (grades 2–4) was 18% (95% confidence interval (CI), 6–30%) for CTCD34+ and 21% (95% CI, 14–28%) for FB-RIC groups ($P=0.8$). The cumulative incidence of chronic GVHD (cGVHD) at 4 years was 32 and 71%, respectively ($P<0.01$).

NRM and other post transplant outcomes

The median follow-up for survivors was around 4 years as of 30 March 2007. The transplant group had no impact on any outcome at 4 years post transplant. Table 1 shows in detail the 4-year incidence of relapse, DFS and OS (including the ITT analysis for DFS and OS).

Results of univariate and multivariate analyses of NRM (primary end point of the study) are shown in detail in Table 2. The 4-year incidence of NRM was 20 and 19% in the FB-RIC and CTCD34+ group, respectively ($P=0.8$). Multivariate analysis was done in the whole patient population, while only univariate analyses were done separately in each transplant group due to the small sample sizes. Of note, a high HCT-comorbidity showed a strong deleterious impact in both patient groups (Figure 1).

In multivariate analysis, only not developing cGVHD (hazard ratio 5.8, 95% CI 1.6–24, $P=0.04$) had an independent impact on relapse (10% incidence in patients with and 38% in patients without cGVHD, $P=0.01$). For OS and DFS, in multivariate analysis, the only variables that showed an impact were not developing cGVHD (hazard ratio 3.6, 95% CI 1.2–20, $P=0.02$ for OS; hazard ratio 5.3, 95% CI 1.2–29, $P=0.02$ for DFS) and a high HCT-comorbidity index ($P=0.05$ for OS and $P=0.06$ for DFS), while a trend was found for male recipient with a female donor ($P=0.06$ for OS and $P=0.08$ for DFS).

Only two variables clearly had an opposite impact on post transplant outcomes in the univariate analyses done separately in each transplant group: (i) patient age (<42 vs ≥ 42 years) had an impact on NRM, OS and DFS only in the CTCD34+ group (Figure 2a); while (ii) the dose of CD34+ cells/kg infused ($\geq 6 \times 10^6$ vs $< 6 \times 10^6$ /kg) had an impact on survival only in the FB-RIC group (Figure 2b).

In keeping with previous observations, all early post transplant extrahematological toxicities were milder in the FB-RIC group, leading to fewer days of hospitalization in the first 30 days after transplant for supportive care, mainly due to gastrointestinal toxicity (median 9 vs 20 days in the FB-RIC and CTCD34+ group, respectively; $P<0.02$). However, the median number of readmissions after day +30 and up to 1 year post transplant was higher in the FB-RIC group (3 (range: 0–6) vs 1 (range: 0–4) readmission, respectively; $P<0.05$), mostly due to severe infections and/or gastrointestinal GVHD (details not shown).

The proportion of surviving patients with a Karnofsky score of $\geq 90\%$ in the CTCD34+ vs the FB-RIC groups was 50 vs 30%, respectively, at 1 year, 75 vs 40% at 2 years and 90 vs 60% at 4 years.

Bone Marrow Transplantation

a

Non-Relapse Mortality

HCT-CI ≥ 3

HCT-CI < 3

Months post-transplantation

| | | | | |
|--|----|----|----|----|
| Patients Alive & Well at each time point | 35 | 26 | 23 | 14 |
|--|----|----|----|----|

b

Non-Relapse Mortality

HCT-CI ≥ 3

HCT-CI < 3

Months post-transplantation

| | | | | |
|--|----|----|----|----|
| Patients Alive & Well at each time point | 39 | 29 | 22 | 14 |
|--|----|----|----|----|

Figure 1 Incidence of non-relapse mortality (NRM) (a) in the CTCD34+ group by the hematopoietic cell transplantation-comorbidity index (HCT-CI); the 4-year NRM in patients with an HCT-CI ≥ 3 and < 3 was 65 and 10%, respectively ($P=0.01$). (b) In the FB-RIC group, the 4-year NRM was 45 and 7%, respectively ($P=0.04$).

Discussion

Elderly age has been considered a major risk factor for failure of a conventional myeloablative alloHSCT, attributed mainly to a high early post transplant conditioning-related NRM. The results obtained from this single-center prospective study suggest that the negative impact of elderly age on the outcome of alloHSCT for patients with early-status AML and MDS can be reduced with an RIC protocol. We believe that the main strength of this study is the prospective ‘age-randomized’ nature of the trial. In the context of a single-center consecutive patient cohort, ‘age randomization’ can be a suitable way of comparing two

Artículo 3: Martino R, Valcarcel D, Brunet S et al “Comparable non-relapse mortality and survival after HLA-identical sibling blood stem cell transplantation with reduced or conventional-intensity preparative regimens for high-risk myelodysplasia or acute myeloid leukemia in first remission”

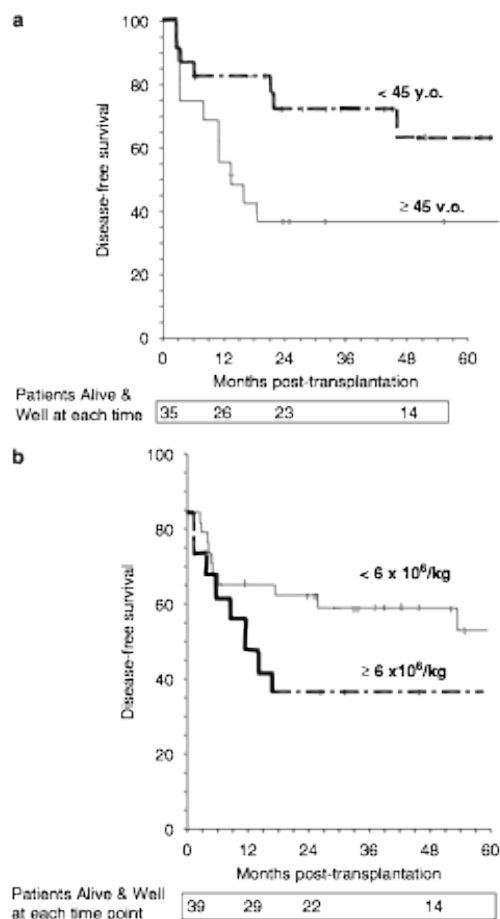


Figure 2 Probability of disease-free survival (DFS) (a) in the CTCD34+ group by patient age; the 4-year DFS in patients ≥ 42 and < 42 years old was 37 (95% confidence interval (CI), 19–55%) and 64% (95% CI, 49–79%), respectively ($P=0.08$). (b) In the FB-RIC group, the 4-year DFS in patients who received a CD34+ cell dose in the graft $\leq 6 \times 10^6$ and $> 6 \times 10^6$ /kg was 42 (95% CI, 19–65%) and 72% (95% CI, 55–89%), respectively ($P=0.05$).

transplant strategies, while eliminating potentially unknown selection biases.²¹ In addition, we analyzed survival according to the ITT principle to avoid misleading interpretations and biased treatment effects,¹⁹ since reasonable doubts have arisen as to the true impact of RIC alloHSCT to elderly patients due to the various biases that lead to selection of only very fit older patients.^{23–25} The similar 4-year OS and DFS in this ITT analysis suggest that RIC alloHSCT may be proposed for elderly patients with AML/MDS. Other strengths of this study are the inclusion only of patients with very poor-risk AML/MDS, the relatively long median follow-up of 4 years and the homogeneous

donor type, stem cell source and conditioning regimen used in each cohort.

On the other hand, the main weakness of the current study is the small sample sizes, and, as previously highlighted, the age-dependent differences in the biological characteristics of AML and high-risk MDS. Because of these differences, only the statistical analyses of NRM are shown. In addition, many centers would disagree with the conventional high-dose conditioning chosen for young patients and the RIC strategy chosen for elderly patients; it should be stressed, however, that these strategies showed good outcomes in each age group in our previous single-arm studies, and this prompted us to choose them and keep them homogeneous throughout the study. The trend for increased NRM in the CTCD34+ group in the patients with an age near 50 and the relatively low NRM in the FB-RIC group suggest that our goals may have been met. Interestingly, the higher NRM in patients with a high HCT-comorbidity index in both age groups (Figure 1) is in line with previous observations, confirming that comorbidities, and not simply age alone, may help identify proper candidates for RIC regimens.²⁰

In summary, these single-center results suggest that in this disease setting, the expected high NRM in elderly patients can be reduced with an RIC regimen, leading to equivalent survival when compared to young patients receiving a myeloablative alloPBSCT from an HLA-identical sibling. Our study was not powered to identify the impact of the type of conditioning on other outcomes, and for this purpose, a larger multicenter protocol is ongoing.

Acknowledgements

This study was performed in the setting of the CETLAM cooperative group (Grupo Cooperativo para el Estudio y Tratamiento de las Leucemias Agudas y Mielodisplasias, protocols CET-LAM-99 and CET-LAM-2003), in part with grants C03/010 and 603/008 from the Instituto de Salud Carlos III and two grants from Fundació d'Investigació Sant Pau and Fundació 'La Caixa' (Barcelona, Spain).

Specific contribution(s) of each coauthor: RM: conceived and executed the research reported in the paper, the integrity and data analysis, was involved in patient care and wrote the various versions of the manuscript. In addition, he also had the task of data management and statistical analyses. DV: collaborated in patient care, data management and the statistical analyses. All other co-authors contributed in the conception and execution of the research reported in the paper and in-patient care, and participated in writing or interpreting relevant parts of the manuscript.

References

- 1 Appelbaum FR, Pearce SF. Hematopoietic cell transplantation in first complete remission versus early relapse. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; **19**: 333–339.
- 2 de WT, Oosterlind M, Span B, Muus P, Schattenberg A. Stem cell transplantation for leukemias following myelodysplastic

Artículo 3: Martino R, Valcarcel D, Brunet S et al “Comparable non-relapse mortality and survival after HLA-identical sibling blood stem cell transplantation with reduced or conventional-intensity preparative regimens for high-risk myelodysplasia or acute myeloid leukemia in first remission”

38

Comparison of conditioning regimens in AML/MDS
R Martino et al

syndromes or secondary to cytotoxic therapy. *Rev Clin Exp Hematol* 2002; 6: 72–85.

- 3 Martino R, Iacobelli S, Brand R, Jansen T, van Biezen A, Finke J et al. Retrospective comparison of reduced-intensity conditioning and conventional high-dose conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using HLA-identical sibling donors in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2006; 108: 836–846.
- 4 de Lima M, Giralt S. Allogeneic transplantation for the elderly patient with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Semin Hematol* 2006; 43: 107–117.
- 5 de Lima M, Anagnostopoulos A, Munsell M, Shahjahan M, Ueno N, Ippoliti C et al. 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.
- 6 Niederwieser D, Lange T, Cross M, Basara N, Al-Ali H. Reduced intensity conditioning (RIC) haematopoietic cell transplants in elderly patients with AML. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; 19: 825–838.
- 7 Lazarus HM, Rowe JM. Reduced-intensity conditioning for acute myeloid leukemia: is this strategy correct. *Leukemia* 2006; 20: 1673–1682.
- 8 Ho AY, Pagliuca A, Kenyon M, Parker JE, Mijovic A, Devereux S et al. Reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia using fludarabine, busulfan, and alemtuzumab (FBC) conditioning. *Blood* 2004; 104: 1616–1623.
- 9 Scott BL, Sandmaier BM, Storer B, Maris MB, Sorror ML, Maloney DG et al. 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.
- 10 Shimoni A, Hardan I, Shem-Tov N, Yeshurun M, Yerushalmi R, Avigdor A et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in AML and MDS using myeloablative versus reduced-intensity conditioning: the role of dose intensity. *Leukemia* 2006; 20: 322–328.
- 11 Aoudjhane M, Labopin M, Gorin NC, Shimoni A, Ruutu T, Kolb HJ et al. Comparative outcome of reduced intensity and myeloablative conditioning regimen in HLA identical sibling allogeneic hematopoietic 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.
- 12 Martino R, Caballero MD, Simon JA, Canals C, Solano C, Urbano-Ispizua A et al. Evidence for a graft-versus-leukemia effect after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2002; 100: 2243–2245.
- 13 Martino R, Perez-Simon JA, Moreno E, Queraltó JM, Caballero D, Mateos M et al. Reduced-intensity conditioning allogeneic blood stem cell transplantation with fludarabine and oral busulfan with or without pharmacokinetically targeted busulfan dosing in patients with myeloid leukemia ineligible for conventional conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 437–447.
- 14 Suci S, Mandelli F, de Witte T, Zittoun R, Gallo E, Labar B et al. Allogeneic compared with autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1): an intention-to-treat analysis of the EORTC/GIMEMAAML-10 trial. *Blood* 2003; 102: 1232–1240.
- 15 Brunet S, Esteve J, Berlanga J, Ribera JM, Bueno J, Martí JM et al. Treatment of primary acute myeloid leukemia: results of a prospective multicenter trial including high-dose cytarabine or stem cell transplantation as post-remission strategy. *Haematologica* 2004; 89: 940–949.
- 16 Muñoz L, Aventin A, Villamor N, Junca J, Acobedo G, Domingo A et al. Immunophenotypic findings in acute myeloid leukemia with FLT3 internal tandem duplication. *Haematologica* 2003; 88: 637–645.
- 17 Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89: 2079–2088.
- 18 Urbano-Ispizua A, Brunet S, Solano C, Moraleda JM, Rovira M, Zuazu J et al. Allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood in patients with myeloid malignancies in early phase: a case control comparison with unmodified peripheral blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 349–354.
- 19 Newell DJ. Intention-to-treat analysis: implications for quantitative and qualitative research. *Int J Epidemiol* 1992; 21: 837–841.
- 20 Sorror ML, Maris MB, Storb R, Baron F, Sandmaier BM, Maloney DG et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood* 2005; 106: 2912–2919.
- 21 Gray R, Wheatley K. How to avoid bias when comparing bone marrow transplantation with chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 1991; 7 (suppl 3): 9–12.
- 22 Valcarcel D, Martino R, Caballero D, Mateos MV, Perez-Simon JA, Canals C et al. Chimerism analysis following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 387–392.
- 23 Mengis C, Aebi S, Tobler A, Dahler W, Fey MF. Assessment of differences in patient populations selected for or excluded from participation in clinical phase III acute myelogenous leukemia trials. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3933–3939.
- 24 Estey E, de Lima M, Tibes R, Pierce S, Kantarjian H, Champlin R et al. Prospective feasibility analysis of reduced intensity conditioning regimens (RIC) for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in elderly patients with acute myeloid leukemia (AML) and high-risk myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood* 2007; 109: 1395–1400.
- 25 Deschler B, de Witte T, Mertelsmann R, Lubbert M. Treatment decision-making for older patients with high-risk myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia: problems and approaches. *Haematologica* 2006; 91: 1513–1522.

Apéndice: Estudio de quimerismo hematopoyético en el trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida

La introducción de los acondicionamientos de intensidad reducida requirió la realización de estudios que analizaran su capacidad para lograr el injerto hematopoyético y describiesen la cinética del mismo. En este estudio prospectivo analizamos, mediante la amplificación de “shot tandem repeats”, el quimerismo en médula ósea y sangre periférica en un grupo de 68 pacientes que recibieron un trasplante con acondicionamiento de intensidad reducida (Alo-TIR).

Se observó injerto en la totalidad de los pacientes, sin fallos de injerto primarios ni secundarios durante el tiempo de seguimiento del estudio. La probabilidad de alcanzar quimerismo completo del donante (QCD) en sangre total fue del 70%, 85% y 95% en los días +30, +100 y +180, respectivamente. El estudio en subpoblaciones demostró que mientras en neutrófilos se alcanzó QCD en el día +30, la población de linfocitos T tardó más tiempo en injertar, con diferencias según se usase melfalán o busulfán como agente alquilante (100% vs 0% en el día +30 y 93% vs 20% en el día +90, respectivamente). El único factor que se asoció a una adquisición más rápida de QCD fue el haber recibido más de dos líneas de tratamiento pretrasplante. Por otra parte en este estudio no se pudo demostrar que la obtención de QCD se relacionase con una diferente evolución en cuanto a enfermedad injerto contra receptor, supervivencia global o recidiva de la enfermedad.

Nuestro trabajo concluyó que con nuestro esquema de Alo-TIR se alcanzó un estado de QCD en la práctica totalidad de los pacientes en los primeros seis meses y que fue más rápido en la serie mieloide que en la serie linfoide, donde tuvo cierta relación con un mayor estado de inmunodepresión o quizás con el uso de melfalán.



Chimerism

Chimerism analysis following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning

D Valcárcel¹, R Martino¹, D Caballero², MV Mateos², JA Pérez-Simón², C Canals¹, F Fernández³, J Bargay⁴, E Muñiz-Díaz⁵, M Gonzalez², JF San Miguel² and J Sierra¹

¹Division of Clinical Hematology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; ²Department of Hematology, Hospital Clínic Universitario de Salamanca, Spain; ³Department of Hematology, Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, Spain; ⁴Department of Hematology, Hospital de Son Dureta de Mallorca, Spain; and ⁵Blood Bank, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

Summary:

We have performed a prospective study to evaluate early chimerism and its kinetics after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation among 68 patients who received a reduced-intensity conditioning (RIC) regimen with fludarabine plus melphalan ($n=40$) or busulphan ($n=28$). Chimerism was analyzed by polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats in unfractionated (UF) and/or fractionated nucleated cells from bone marrow and peripheral blood (PB). All of the patients showed initial donor engraftment and no patient presented primary or secondary graft failure. In UF samples, the probability of achieving stable complete donor chimerism (CDC) in PB within the first 6 months was 70% on day +30, 85% on day +100 and 95% on day +180. CDC in granulocytes was observed in nearly all cases from day +30 onwards. CDC in T cells, however, differed among melphalan and busulphan recipients during the first 3 months (100 vs 0% on day +30 and 93 vs 20% on day +90, respectively). In multivariate analysis, the only significant variable associated with the achievement of early CDC was having received more than two lines of chemotherapy pretransplant ($P<0.02$). No correlation was found between the rate of achieving early CDC and the occurrence of acute graft-versus-host disease (GVHD) or disease progression post-transplant. In multivariate analysis, the only variable that influenced the incidence of disease progression post-transplant was the development of chronic extensive GVHD ($P<0.05$). In conclusion, a state of CDC is readily obtained within the first 6 months after our RIC protocols. Donor myeloid engraftment occurs rapidly in all cases, while early T-cell CDC is more common in more immunosuppressed hosts and, perhaps, in melphalan recipients.

Bone Marrow Transplantation (2003) 31, 387–392.
doi:10.1038/sj.bmt.1703846

Keywords: chimerism; reduced-intensity conditioning; allotransplant; graft-versus-host disease

Reduced-intensity conditioning (RIC) regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) are being increasingly used for the treatment of hematological malignancies and solid tumors.^{1–7} These preparative regimens are usually offered to patients who are poor candidates for conventional myeloablative allogeneic HSCT because of advanced age, medical comorbid diseases or second transplants.^{5–7} RIC regimens base their therapeutic effect on graft-versus-tumor (GVT) effect that is mediated by T lymphocytes, with little effect due to the conditioning itself. For this reason, it may be necessary to obtain complete and stable donor chimerism of T lymphocytes. Nevertheless, few studies are available on the kinetics of lymphoid and myeloid engraftment following RIC allografts.

We have performed a prospective study to evaluate early chimerism and its kinetics after RIC regimens with allogeneic SCT using polymerase chain reaction (PCR) amplification of short tandem repeats (STR).

Patients and methods

Patients

Between December 1998 and April 2001, 90 patients underwent an RIC allogeneic peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT) in nine Spanish institutions within a prospective trial. Details of the study have been previously published.⁷ A total of 70 consecutive patients from four of the participating institutions were included in the current study. Two patients died on days +9 and +22 from pneumonia and multiorgan failure and were not included in the analyses.

Patient characteristics are shown in Table 1. The median age was 52 years (range 19–62). Disease phase at transplant was categorized as early in 17 (25%) patients (acute

Correspondence: Dr R Martino, Servei d'Hematologia Clínica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Av. Sant Antoni Maria Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain
Received 4 July 2002; accepted 4 October 2002

Trabajo 4:Chimerism análisis following allogeneic Peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning

388

Chimerism analysis following allogeneic PBSCT
D Valcárcel et al

Table 1 Patient characteristics

| | <i>Flu-melphalan conditioning</i> | <i>Flu-busulphan conditioning</i> | <i>All patients</i> |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| No. of patients | 40 | 28 | 68 |
| Age, median (range) | 49 (19–63) | 57 (34–66) | 52 (19–66) |
| Sex (M/F) | 24/16 | 17/11 | 43/27 |
| <i>Underlying disease</i> | | | |
| Lymphoproliferative syndromes | 33 | 3 | 36 |
| Non-Hodgkin's lymphoma | 8 | 1 | 9 |
| Follicular lymphoma | 6 | 1 | 7 |
| Diffuse large B-cell lymphoma | 1 | — | 1 |
| Peripheral T-cell lymphoma | 1 | — | 1 |
| Hodgkin's disease | 5 | 1 | 8 |
| Multiple myeloma | 13 | — | 13 |
| Chronic lymphocytic leukemia | 7 | — | 7 |
| Myeloid malignancies | 1 | 25 | 27 |
| Acute myeloid leukemia | 1 | 9 | 10 |
| Myelodysplastic syndrome | — | 10 | 10 |
| Chronic myeloid leukemia | — | 6 | 6 |
| Acute lymphoblastic leukemia | 6 | — | 6 |
| Myelofibrosis | — | 1 | 1 |
| <i>Disease phase at transplant</i> | | | |
| Early | 4 | 13 | 17 |
| Intermediate | 12 | 9 | 21 |
| Advanced | 24 | 6 | 32 |
| Prior stem cell transplant (%) | 19 (50) | 5 (18) | 26 (37) |
| Median ECOG performance scale | 0 | 0 | 0 (0–2) |
| Donor–recipient sex mismatch (%) | 17 (43) | 11 (39) | 29 (41) |
| Do/Re CMV seropositive (%) | 35 (88) | 27 (96) | 64 (91) |
| CD34+ cells infused ($\times 10^6$ /kg recipient weight), median (range) | 4.8 (1.9–9.1) | 4.6 (2–15.6) | 4.7 (1.9–15.6) |

Flu: fludarabine. ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group Performance Scale; 0: asymptomatic, 1: symptomatic, fully ambulatory; 2: symptomatic, in bed <50% of the day; 3: symptomatic, in bed >50% of the day; 4: bedridden; Do/Re: Donor/receptor; CMV: cytomegalovirus.

leukemia or poor-risk myelodysplasia in first complete remission, untreated good risk myelodysplasia, first chronic phase of chronic myeloid leukemia (CML), lymphoid malignancy in first remission), intermediate in 21 (31%) patients (acute leukemia or myelodysplasia in second or higher complete remission, accelerated phase CML or lymphoid malignancy in second or higher remission) and as advanced phase in 30 (44%) patients (refractory or relapsed acute leukemia or myelodysplasia, blastic phase CML and all second transplants).

Disease status at transplant differed between the two conditioning regimens. In all, 24 (60%) patients with advanced disease were transplanted in the melphalan regimen, whereas only six (21%) patients who received the busulphan regimen were in an advanced status at transplant ($P=0.001$). Additionally, a prior HSCT had been performed in 19 (49%) and 5 (18%) patients, respectively ($P=0.01$). Consequently, melphalan recipients were more heavily pretreated than busulphan recipients; the number of patients who had received more than two lines of chemotherapy (including a prior transplant as a 'line of chemotherapy') were 22 (55%) and three (11%), respectively ($P<0.001$).

Conditioning regimens

Two different RIC regimens were used, one for lymphoid and one for myeloid malignancies except for four patients who were given the alternative regimen since they had received a prior transplant that included in the conditioning

regimen the assigned drug (Table 1). The myeloid RIC regimen ($n=28$) consisted of fludarabine 30 mg/m² intravenously (i.v.) between days -9 and -5 and busulphan 1 mg/kg \times 10 doses on days -6 to -4 (total 10 mg/kg). The lymphoid regimen ($n=40$) consisted of fludarabine 30 mg/m² i.v. on days -8 to -4 followed by melphalan 70 mg/m² i.v. on day -3 and -2. PBSC were infused on day 0.

Graft versus host disease (GVHD) prophylaxis and supportive care

GVHD prophylaxis consisted of cyclosporine A (CsA) and a short course of methotrexate. CsA was given at a dose of 1 mg/kg/day i.v. or by mouth from day -7 to -2, and then 2 mg/kg/day from day -1. Levels were maintained in the therapeutic range until tapered. In cases when acute GVHD grade >1 did not develop, CsA was tapered 10% weekly starting on day +90 and discontinued if no GVHD appeared by day +150. Methotrexate was given at a dose of 10 mg/m² on days +1, +3 and +6, followed by folic acid rescue. Acute and chronic GVHD were graded according to established criteria.⁸ Moderate-to-severe GVHD was defined as the presence of grades II–IV acute GVHD and/or extensive chronic GVHD. Standard supportive care was used in all cases, as specified elsewhere.⁷

Chimerism analysis

Serial samples of peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) were analyzed for degrees of donor–recipient

Trabajo 4:Chimerism análisis following allogeneic Peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning

Chimerism analysis following allogeneic PBSCT
D Valcárcel et al



389

chimerism using PCR of informative minisatellite loci. Samples were obtained at least after hematological recovery (days +21 to +30), at 3 months, 6 months, 9 months, 1 year, and between 18 and 24 months post transplant. Additional samples were analyzed if deemed appropriate by the attending physicians. Chimerism studies were performed with a commercially available automated kit (profiler Plus; Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) with semiautomatic electrophoresis (ABI Prism 377 DNA Sequencer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The kit uses multiplex amplification of nine STRs loci (D3S1358, VWA, FGA, D5S818, D13S317, D7S820, D8S1179, D21S11 and D18S51) plus the gender marker Amelogenin that allows quantification of the percentage of donor and recipient DNA in the sample studied. DNA was extracted following standard protocols. To evaluate lineage chimerism, lysis buffer was added to PB and a selection of CD3+ve and CD19+ve cells from PB was done using immunomagnetic beads.

Complete donor chimerism (CDC) was defined as the presence of at least 95% donor DNA in the sample analyzed. Definition of CDC was based on the donor chimerism of T cells if available ($n=26$) or unfractionated (UF) nucleated cells ($n=42$). Stable CDC was defined as the presence of two consecutive CDC in PB without later graft failure. Early CDC was defined as the establishment of stable CDC in PB samples within the first 100 days after transplant.

Donor lymphocyte infusions (DLIs)

Our protocol recommended DLIs only in case of progressive loss of donor chimerism or disease progression without prior or concurrent moderate-to-severe GVHD. With this criteria DLIs were given to eight patients, all of whom had previously reached stable CDC without GVHD and showed signs of progression of the underlying disease.

Statistical analysis

The χ^2 statistic or Fisher's exact test was used to establish differences in the distribution of discontinuous variables and Student's *t*-test or Mann-Whitney's *U* test to compare continuous variables. All reported *P* values are two sided, and a significance level of 0.05 was used. Time to onset of CDC was calculated from the time of transplantation using Kaplan-Meier product-limit estimates. Patients were censored at the time of DLI, disease progression (if further salvage chemotherapy was given) or death from any cause, and those who were still alive and progression free at the time of reporting were censored at the last follow-up date. The probability of disease progression post-transplant was calculated using cumulative incidence estimate, with transplant-related mortality considered a competing risk. Logistic regression was used for multivariate analysis of the variables that influenced the achievement of early CDC. Variables included in the models were age, underlying disease (myeloid vs lymphoid), conditioning regimen, status at transplant, prior HSCT, number of prior lines of chemotherapy received (≤ 2 vs > 2) and CD34+ cell/kg infused with the graft. In order to determine whether the

achievement of early CDC influenced the risk of suffering disease progression post transplant, multivariate Cox proportional hazards regression analyses were done. Variables included in the models were age, underlying disease (myeloid vs lymphoid), status at transplant, prior HSCT, number of prior lines of chemotherapy received (≤ 2 vs > 2), GVHD and the onset of CDC. The occurrence of acute GVHD grades II-IV or extensive chronic GVHD and time to onset of CDC were included as time-dependent covariates, and the assumption of proportional hazards over time was tested for all explanatory covariates using a time-dependent covariate.

Results

A total of 433 samples from the 68 evaluable patients were analyzed during the study. Of these, 209 BM samples (202 UF and seven fractionated), and 224 samples of PB were analyzed; UF cells were studied in 108 samples, fractionated cells in 48 samples and both analyses were done in 68 samples. In these latter samples, chimerism analyses of UF cells and fractionated T-cells showed concordant results in 64 cases (94%) (ie: CDC in 63 and mixed chimerism (MC) in one case). In the other four cases, the percentage of donor cells in UF and T-cells were 100/65, 96/67, 97/85 and 100/90.

Chimerism was analyzed in UF nucleated cells from at least one sample of BM or PB in 56 (85%) patients in at least one occasion, while in 42 (62%) cases fractionated T cells and granulocytes were studied in at least one occasion. Only UF samples were studied in 26 (38%) patients, both UF and fractionated samples in 30 (44%) and only fractionated cells in 12 (18%) patients. Of the 42 patients who had T-cell chimerism studied on at least one occasion, only 26 had at least two consecutive PB samples studied with fractionated cells; these 26 patients will be referred to as those 'studied with fractionated T cells'.

Chimerism analysis in UF nucleated cells

All of the patients showed initial donor engraftment and no patient presented primary or secondary graft failure. On the first chimerism analysis performed around day +30, 44 out of 54 patients analyzed (82%) showed CDC in BM and 43 out of 45 (96%) in PB samples. In those cases with MC the percentage of donor cells ranged from 60 to 94% donor cells in BM ($n=10$) and 86% in PB ($n=2$). As shown in Table 2a there were no differences between conditioning regimens. Similar rates of CDC in both treatment groups were found on later time points. Beyond 6 months post-transplant, most patients showed CDC in both BM and PB (see Table 2a). The probability of achieving stable CDC in PB within the first 6 months was 70% on day +30, 85% on day +100 and 95% on day +180 (see Figure 1a).

Chimerism analysis in fractionated nucleated cells (granulocytes and T-cells)

A total of 116 samples were analyzed from PB using fractionated nucleated cells. The analysis of chimerism in

Trabajo 4:Chimerism análisis following allogeneic Peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning



Table 2 Complete donor chimerism in (a) unfractionated nucleated cells from bone marrow and peripheral blood after reduced-intensity conditioning allogeneic PBSCT (% in parentheses) and (b) fractionated nucleated cells from peripheral blood after reduced-intensity conditioning allogeneic PBSCT (% in parentheses)

| Days post transplant ^a | No. patients studied | | Flu-melphalan conditioning | | Flu-busulphan conditioning | | Overall CDC | |
|---|----------------------|----|----------------------------|----------|----------------------------|----------|-----------------|----------|
| | BM ^b | PB | BM ^b | PB | BM ^b | PB | BM ^b | PB |
| <i>(a) Unfractionated nucleated cells</i> | | | | | | | | |
| 30 | 54 | 45 | 25 (81) | 28 (100) | 19 (83) | 15 (88) | 44 (82) | 43 (96) |
| 90 | 41 | 38 | 25 (85) | 23 (85) | 9 (64) | 10 (91) | 34 (83) | 34 (89) |
| 180 | 31 | 33 | 20 (95) | 19 (95) | 10 (100) | 11 (85) | 30 (97) | 30 (90) |
| 270 | 19 | 20 | 11 (100) | 11 (92) | 7 (87) | 8 (100) | 18 (95) | 19 (95) |
| 360 | 25 | 25 | 15 (94) | 14 (100) | 9 (100) | 11 (100) | 25 (96) | 25 (100) |
| 540-720 | 17 | 17 | 7 (100) | 7 (100) | 10 (100) | 8 (89) | 17 (100) | 15 (94) |
| | | | TL | GR | TL | GR | TL | GR |
| <i>(b) Fractionated nucleated cells</i> | | | | | | | | |
| 30 | 22 | | 14 (100) | 14 (100) | 0 | 7 (78) | 14 (64) | 21 (95) |
| 90 | 26 | | 14 (93) | 15 (94) | 2 (20) | 8 (80) | 15 (63) | 23 (88) |
| 180 | 23 | | 13 (100) | 13 (100) | 9 (90) | 10 (100) | 22 (96) | 23 (100) |
| 270 | 12 | | 5 (83) | 5 (85) | 5 (83) | 6 (100) | 10 (83) | 11 (92) |
| 360 | 19 | | 75 (100) | 8 (100) | 10 (91) | 11 (100) | 17 (94) | 19 (100) |
| 540-720 | 14 | | 6 (100) | 6 (100) | 8 (100) | 8 (100) | 12 (100) | 14 (100) |

^aPBSCT: peripheral blood stem cells transplantation. Flu: fludarabine; BM: bone marrow; PB: peripheral blood; CDC: complete donor chimerism; M: months; TL: T lymphocytes; GR: granulocytes.

^bPatients who had >5% bone marrow infiltration at these time points were not included in the analysis of chimerism data.

^cPatients who received DLI for disease progression or persistent mixed chimerism were censored at the time of DLI for further chimerism data.

fractionated cells showed that early post transplant the presence of CDC was more frequent in granulocytes than in early T cells. Among 22 patients studied around day +30, 21 (95%) showed CDC in granulocytes and 14 (64%) in T cells. As shown in Table 2b, all MC occurred in patients conditioned with busulphan, who had 55-70% donor T cells at this early time point ($n=8$), while all 14 patients conditioned with melphalan showed CDC both in granulocytes and lymphocytes ($P<0.001$ for T-cell CDC between groups). In the third month post transplant, 23/26 patients (88%) showed CDC in granulocytes and 15/26 (63%) in T-cells. Again, there were no differences in the rates of CDC in granulocytes among melphalan and busulphan recipients (94 vs 80%, respectively), but there were still significant differences in the rates of CDC in T-cells (93 vs 20%, respectively; $P<0.01$). In the eight busulphan recipients with T-cell MC at this time point, the level of donor chimerism ranged from 66 to 94%. Thereafter, most patients showed CDC in both granulocytes and T-cells with no differences between melphalan and busulphan recipients (see Table 2b). The probability of achieving stable CDC within the first 6 months post transplant was lower when the analyses was performed in fractionated T-cells ($n=26$) than when the analysis was performed on UF samples: 43 vs 77% on day +30, 60 vs 92% on day +100 and 85 vs 97% on day +180, respectively ($P<0.004$) (Figure 1b).

Influence of prior treatments on chimerism status

The factors influencing the probability of achieving early stable CDC were studied. Several factors were found to be statistically significant in univariate analysis. These factors were lymphoid vs myeloid malignancy (90 vs 48%,

$P<0.001$), more than two vs one or two prior lines of chemotherapy (96 vs 60%, $P=0.001$), having received a prior HSCT (92 vs 54%, $P=0.01$) and melphalan vs busulphan conditioning (90 vs 50%, $P<0.001$). However, in multivariate analysis the only significant variable was having received more than two lines of chemotherapy pretransplant ($P<0.02$).

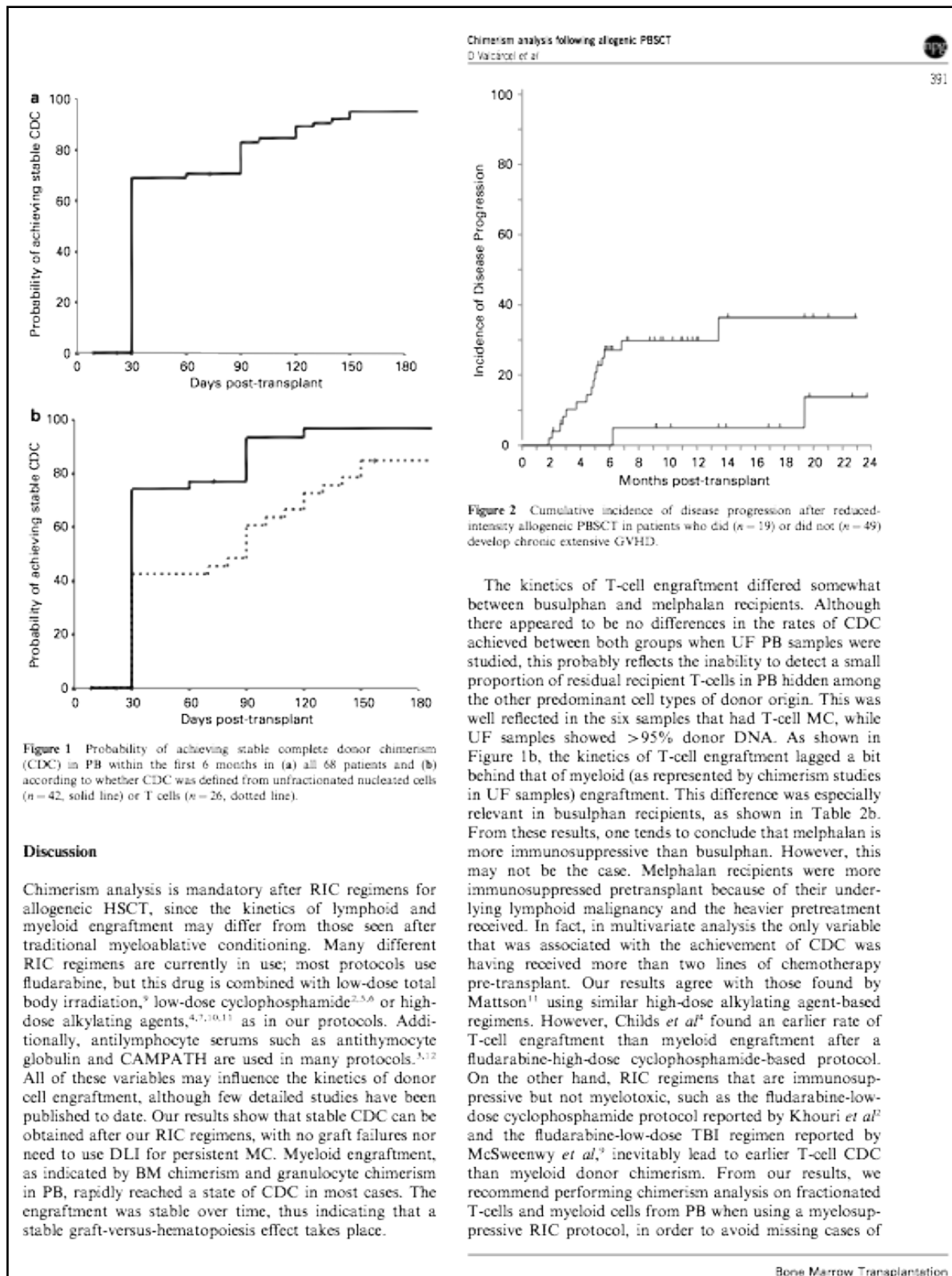
Chimerism analysis and GVHD

Moderate-to-severe GVHD occurred in 35 out of 59 evaluable patients (41%). A total of 68 patients were evaluable for acute GVHD and 57 patients were evaluable for chronic GVHD, of which 29 (43%) and 37 (65%) developed acute and chronic GVHD, respectively. Moderate-to-severe GVHD developed in 28 of 52 (54%) patients who achieved early CDC and in seven out of 17 (41%) with MC ($P=0.4$). Among patients whose early chimerism was studied using fractionated T-cells, moderate-to-severe GVHD occurred in nine out of 17 (53%) patients with T-cell CDC and five out of 12 (42%) with MC ($P=0.7$).

Progression-free survival

The median overall follow-up was 12 months (range, 9-24), and 49 (70%) patients were alive at the time of analyses (November 2001). In multivariate analysis, the only variable that influenced the incidence of disease progression post-transplant was the development of chronic extensive GVHD. The incidence of disease progression at 1 year in patients with ($n=49$) and without ($n=19$) chronic extensive GVHD was 6 and 30%, respectively ($P<0.05$) (Figure 2).

Trabajo 4:Chimerism análisis following allogeneic Peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning



Trabajo 4:Chimerism análisis following allogeneic Peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning

MC in T-cells. Once a stable T-cell CDC is reached, UF samples can be used for further studies since graft failures are very rare.

The establishment of CDC has been considered a prerequisite for the onset of GVHD and for a GVT effect, both after conventional myeloablative transplants^{13–15} and RIC allografting.^{3,11,16} We were however unable to find a cause-effect correlation between the onset of CDC and GVHD. Once GVHD occurred, however, all patients were later found to be in CDC. Our results agree with those found by Mattson *et al.*¹¹ Both studies, however, have similar limitations in their design for finding such an association. Our chimerism studies were performed only twice during the first 100 days post transplant. Since the kinetics of donor cell engraftment can change rapidly early after an RIC allograft, it is possible that patients in MC who later developed GVHD eventually switched to a state of CDC before developing GVHD. The fact that all such patients were in CDC after GVHD was diagnosed supports this hypothesis. In the study by Childs *et al.*,⁴ T-cell chimerism was followed very closely after transplant, and an association was found between the development of CDC and onset of GVHD.

Since most of our patients reached a state of stable CDC in both UF and fractionated T-cells by 6 months post transplant, it is not surprising that we did not find any relation between CDC and disease progression post transplant. After a myeloablative HSCT, the GVT effect is strongly associated with GVHD,^{17,18} and the only variable that we found to be protective against disease progression after an RIC allograft was the development of moderate-to-severe GVHD. Since we had very few patients who were in stable MC during follow-up, we were unable to analyze the possible occurrence of a GVT effect in such a setting.

In conclusion, a state of CDC is readily obtained within the first 6 months after our RIC protocols. Donor myeloid engraftment occurs rapidly in all cases, while early T-cell CDC is more common in more immunosuppressed hosts. The high rate of CDC achieved explains the high incidence of chronic GVHD seen, which is similar to unmanipulated PBSCT recipients,¹⁹ and the GVT that occurs after these RIC allografts.

References

- 1 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.
- 2 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.
- 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 Childs R, Clave E, Contentin N *et al.* Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood* 1999; **94**: 3234–3241.
- 5 Carella AM, Champlin R, Slavin S *et al.* Mini-allografts: ongoing trials in humans (editorial). *Bone Marrow Transplant* 2000; **25**: 345–350.
- 6 Carella AM, Giralt S, Slavin S. Low intensity regimens with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as treatment of hematologic neoplasia. *Haematologica* 2000; **85**: 304–313.
- 7 Martino R, Caballero MD, Canals C *et al.* for the alloPBSCT subcommittee of the Spanish Group for Hematopoietic Transplantation (GETH) and the Group GEL-TAMO. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning: results of a prospective multicenter study. *Br J Haematol* 2001; **115**: 653–659.
- 8 Ferrara JLM, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1991; **324**: 667–674.
- 9 McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA *et al.* Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood* 2001; **97**: 3390–3400.
- 10 Giralt S, Thall PF, Khouri I *et al.* 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.
- 11 Mattsson J, Uzunel M, Brune M *et al.* Mixed chimerism is common at the time of acute graft-versus-host disease response in patients receiving non-myeloablative conditioning and allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2001; **115**: 935–944.
- 12 Kottaridis PD, Milligan DW, Chopra R *et al.* *In vivo* CAMPATH-1H prevents graft-versus-host disease following nonmyeloablative stem cell transplantation. *Blood* 2000; **96**: 2419–2425.
- 13 Antin JH, Childs R, Filipovich AH *et al.* Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 tandem meetings. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; **7**: 473–485.
- 14 Mattsson J, Uzunel M, Remberger M *et al.* T-cell mixed chimerism is significantly correlated to a decreased risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation* 2001; **71**: 433–439.
- 15 Gyger M, Baron C, Forest L *et al.* Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation has predictive value for the occurrence of irreversible graft failure and graft-vs-host disease. *Exp Hematol* 1998; **26**: 426–434.
- 16 Molina A, McSweeney P, Maloney DG *et al.* Degree of early donor T-cell chimerism predicts GVHD and graft rejection in patients with nonmyeloablative hematopoietic stem cell allografts. *Blood* 1999; **94**: 394a.
- 17 Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM *et al.* Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990; **75**: 555–562.
- 18 Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED *et al.* Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 1979; **300**: 1068–1073.
- 19 Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM *et al.* Blood stem cells compared with bone marrow transplantation as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. *Blood* 2000; **95**: 3702–3709.

Discusión

Sobre el apéndice (trabajo 4, anexo 1))

El primero de los trabajos que conforman esta Tesis Doctoral, cronológicamente hablando, está recogido en forma de apéndice y fue publicado en el año 2003. En esa fecha, los estudios iniciales sobre Alo-TIR sugerían su capacidad de lograr un injerto hematopoyético estable y duradero, así como su aplicabilidad en pacientes no candidatos a recibir un trasplante convencional, al ser la MRT “asumible” en pacientes de alto riesgo. (*Giralt S, 1997; Khouri IF, 1998; Slavin S, 1998; Childs R, 1999; Carella AM, 2000 A; Carella AM, 2000 B, Martino R, 2001*).

El objetivo de este estudio fue analizar la cinética del injerto linfóide y mielóide tras Alo-TIR, para lo que se realizaron estudios de quimerismo mediante amplificación con reacción de cadena de la polimerasa (PCR, de *polimerase chain reaction* por sus siglas en inglés) de fragmentos cortos repetidos (STR, de *short tandem repeats* por sus siglas en inglés). Se acepta que el estudio de quimerismo tras Alo-TIR resulta imprescindible, ya que la cinética del injerto mielóide y linfóide puede diferir de la observada en el Alo-TPH con acondicionamiento convencional. Por otro lado, los diferentes esquemas de acondicionamientos englobados bajo el término “intensidad reducida” son múltiples; la mayor parte se basan en combinaciones de fludarabina con dosis bajas de irradiación corporal total, ciclofosfamida u otros agentes alquilantes (como es el caso de nuestro trabajo) y en ocasiones a estos agentes se añade el uso de alemtuzumab o ATG. Todas estas variables pueden influir en la cinética del injerto y los datos publicados al respecto en 2003 eran muy pocos. Nuestros resultados muestran que el régimen de fludarabina con un alquilante en dosis propia de alo-TIR (tanto melfalán como busulfán) permite un injerto mielóide rápido que resulta en quimerismo completo en los primeros 100 días en la mayor parte de los casos, tanto en médula ósea como en sangre periférica. Además, la estabilidad a lo largo del plazo del quimerismo sugiere que se produce un efecto injerto-contra-hematopoyesis del receptor.

El injerto de los linfocitos T es diferente según se haya usado busulfán o melfalán como agente alquilante. Los análisis de quimerismo en sangre periférica total (no

fraccionada en subpoblaciones) sugieren que no hay diferencias en el quimerismo completo con los dos alquilantes. Ello refleja una incapacidad de la técnica de estudio, para detectar en sangre total, niveles bajos de quimerismo mixto de linfocitos T, que pasan desapercibidos entre las células mieloides del donante predominantes. Este hecho lo confirman los seis casos de pacientes con quimerismo completo del donante en sangre total y evidente quimerismo mixto en linfocitos T al analizar las subpoblaciones. En el post-trasplante precoz, la frecuente linfopenia en sangre total y la mayor proporción de neutrófilos pueden llevar a la falsa impresión de quimerismo completo. El quimerismo completo en linfocitos T fue ligeramente más lento que en neutrófilos, como se muestra en la figura 1b de este trabajo; la curva de quimerismo completo en linfocitos T está desplazada a la derecha respecto a la sangre no fraccionada. Esta diferencia fue más acusada en los pacientes que recibieron busulfán, como se detalla en la tabla 2b. Con estos datos se podría pensar que el melafalán tiene una mayor potencia inmunodepresora, pero la diferencia puede ser debida también a otros factores. Los pacientes que recibieron melfalán presentaron probablemente una mayor inmunodepresión pretrasplante, debido tanto a las neoplasias linfoides de base en las que usó este agente, como a ser pacientes que globalmente habían recibido mayor número de líneas de tratamiento antes del trasplante. De hecho, en el análisis multivariado la única variable que se asoció con quimerismo completo precoz fue el haber recibido más de dos líneas terapéuticas antes del trasplante.

Los resultados del trabajo aquí discutido son similares a los publicados por Mattson y colaboradores (*Matson J, 2001*) con un esquema de acondicionamiento muy similar al nuestro. Por el contrario, son diferentes a los de Childs y colaboradores (*Childs R, 1999*) con fludarabina y ciclofosfamida en dosis alta, en los que el quimerismo completo fue más rápido en los linfocitos T que en la línea mieloide. De forma similar, con esquemas poco mielotóxicos y muy inmunodepresores, como las combinaciones de fludarabina con dosis bajas de ciclofosfamida (*Khouri IF, 1998*) o de irradiación corporal total (*McSweeney PA, 2001*), el quimerismo completo mieloide es más tardío que en los linfocitos T. Con los datos de nuestro trabajo, recomendamos la realización de estudios de quimerismo en sangre fraccionada para estudiar tanto la población granulocitaria como la linfocitaria T en sangre periférica, para evitar que pasen desapercibidos casos de quimerismo mixto T. Una

vez se haya alcanzado un estado de quimerismo completo en los linfocitos T, se pueden hacer los estudios en sangre no fraccionada ya que el fallo de injerto secundario es muy infrecuente.

La obtención de un estado de quimerismo completo, se ha considerado un requisito indispensable para el desarrollo de un EICT potente y de EICR, tanto en el contexto de Alo-TPH con acondicionamiento convencional (*Antin JH, 2001; Mattson J, 2001; Gyger M, 1998*) como con acondicionamiento de intensidad reducida (*Slavin S, 1998; Mattsson J, 2001; Molina A, 1999*) En nuestro trabajo no se pudo demostrar una relación causa-efecto entre la obtención de quimerismo completo de linfocitos T y el desarrollo de EICR, ya que algunos pacientes desarrollaron EICR durante el quimerismo mixto. Es de destacar que todos los pacientes que presentaron EICR tuvieron quimerismo completo del donante en linfocitos T en el análisis inmediatamente posterior al desarrollo de la EICR. Resultados similares los publicó Mattson (*Mattsson J, 2001*) y la explicación más plausible es que el periodo entre las determinaciones de quimerismo en ambos estudios fue demasiado prolongado, de manera que no se pudo detectar la conversión de quimerismo mixto a quimerismo completo antes del desarrollo de la EICR. En nuestro trabajo sólo se realizaron dos determinaciones de quimerismo en los primeros 100 días, de forma que es probable que los pacientes que desarrollaron EICR hubiesen pasado de quimera mixta a completa durante el intervalo entre ambas. En el trabajo de Childs y colaboradores se realizó un seguimiento muy cercano del quimerismo y por ello se pudo determinar una clara relación entre la evolución a quimerismo completo y el desarrollo de EICR.

Dado que la mayoría de nuestros pacientes alcanzó quimerismo completo, tanto en células no fraccionadas como en linfocitos T antes de los seis meses y que éste se mantuvo posteriormente, no es extraño que no hayamos detectado ningún impacto en relación con la recidiva de la enfermedad. En el Alo-TPH convencional, el desarrollo de EICR se asocia a EICT; en el mismo sentido, en nuestro trabajo la única variable que se asoció a menor recidiva de la enfermedad de base fue el desarrollo de EICR moderada-severa. El escaso número de pacientes con una situación de quimerismo mixto estable post-trasplante no permitió estudiar la EICT en esta situación.

En conclusión, el quimerismo completo del donante se obtiene en la mayor parte de casos en los primeros seis meses después del trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida, basado en fludarabina y busulfán o melfalán. Con estos esquemas de acondicionamiento, el injerto mieloide se obtiene en todos los casos de forma rápida, mientras que el de linfocitos T es más rápido en los pacientes con mayor inmunodepresión y/o tratamiento previamente al trasplante. La frecuencia y rapidez del quimerismo completo explican la elevada incidencia de EICR crónica, similar a la de los trasplantes con acondicionamiento convencional (*Champlin RE, 2000*) de sangre periférica, así como el potente EICT que se observa tras el Alo-TIR.

Sobre el primer trabajo de la Tesis.

Una vez demostrada la capacidad para alcanzar el injerto estable con el esquema de intensidad reducida antes descrito, el siguiente paso fue estudiar la aplicabilidad de estos esquemas de acondicionamiento en pacientes con neoplasias hematológicas con indicación de Alo-TPH pero no candidatos a trasplante convencional por su alto riesgo de MRT y estudiar si ésta se lograba reducir. Es bien conocido que el Alo-TPH es potencialmente curativo en diversas enfermedades hematológicas, tanto malignas como benignas. También es obvio que el acondicionamiento convencional con altas dosis de quimioterapia y/o radioterapia, se asocia a morbi-mortalidad elevada, especialmente en pacientes de edad avanzada, con comorbilidades o que han recibido previamente un trasplante. La mortalidad está relacionada principalmente con la toxicidad derivada del acondicionamiento y con el desarrollo de EICR. Esto hace que el acceso al Alo-TPH en estos grupos de pacientes de alto riesgo sea muy reducido.

Con la intención de reducir la toxicidad, desde finales de los años 90 se desarrollaron pautas de acondicionamiento denominadas de intensidad reducida (*Giralt S, 1997; Slavin S, 1998*). Estos regímenes procuraron garantizar el injerto hematopoyético del donante con baja toxicidad, para progresivamente desarrollar un sistema hematopoyético (e inmune) nuevo que origine EICL capaz de erradicar

la neoplasia de base. Por lo tanto, en resumen, los Alo-TIR se desarrollaron para permitir que pacientes con un elevado riesgo de mortalidad asociada al procedimiento pudiesen beneficiarse del Alo-TPH.

Los estudios iniciales de Alo-TIR sugerían que la MRT era reducida en comparación con la esperable en pacientes de alto riesgo (*Giralt S, 1997; Slavin S, 1998; McSweeney PA, 2001; Diaconescu R, 2004; Sorrow M, 2004, Couriel DR, 2004*). Pese a ello, pocos estudios compararon directamente la mortalidad con esquemas convencionales vs. los de intensidad reducida y todos ellos mostraron inferior MRT en estos últimos. En 2004, Diaconescu y colaboradores mostraron que el uso de acondicionamientos no mieloablativos resulto ser el factor mas importante asociado a una reducción de la MRT y la toxicidad derivada del acondicionamiento (*Diaconescu R, 2004*). En ese trabajo la reducción de la mortalidad fue especialmente relevante en los pacientes con peores características pretrasplante. En el artículo 1 de la Tesis, nosotros observamos que los pacientes que habían sido previamente tratados con un trasplante autólogo, y por lo tanto presentaban un mayor riesgo de MRT, se beneficiaron especialmente de la reducción de la MRT.

En este primer trabajo de la Tesis, los pacientes que recibieron un acondicionamiento convencional diferían notablemente en algunas características del grupo que recibió acondicionamiento de intensidad reducida. Los pacientes del grupo de acondicionamiento convencional se trasplantaron desde 1995, mientras que el acondicionamiento de intensidad reducida se introdujo en nuestro centro en 1999. Ya que entre 1995 y 1999 no se hicieron cambios substanciales en el tratamiento de soporte, no es de esperar que este aspecto influyera en los resultados. Otras características distintas entre los grupos fueron la edad, la situación de la enfermedad de base y el número de pacientes con un trasplante autólogo previo; es de destacar que todas ellas fueron más desfavorables en el grupo de intensidad reducida.

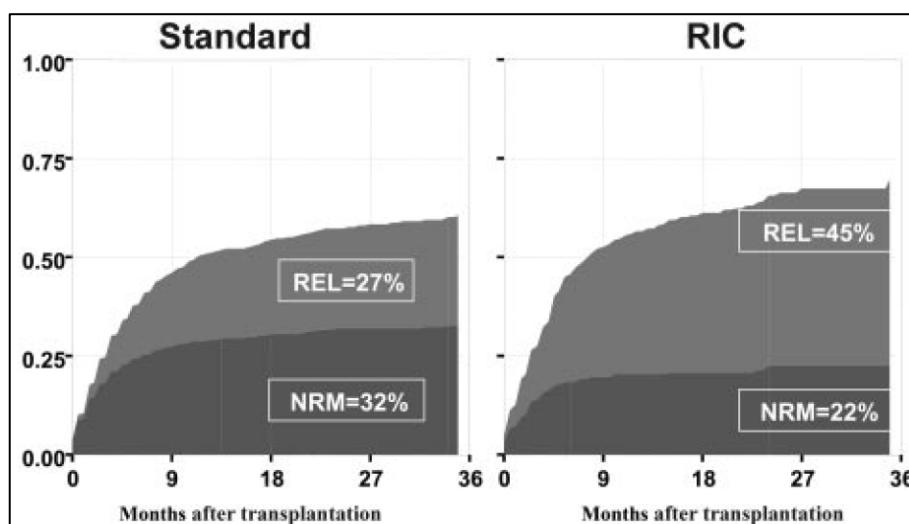
El estudio mostró que el uso acondicionamiento convencional vs. de intensidad reducida fue el factor más importante asociado con MRT, en una única Unidad de Trasplante y durante un periodo de tiempo comparable. Por lo tanto, los llamados “efecto centro” y “efecto tiempo” no influyeron en los resultados, a diferencia de lo

que puede ocurrir en los trabajos multicéntricos retrospectivos. Otras variables clásicamente asociadas a mayor MRT, como la edad, los segundos trasplantes y el diagnóstico también resultaron significativos en nuestro estudio. La serología frente a CMV del paciente no fue un factor significativo, probablemente debido a que sólo 6 pacientes en cada grupo eran CMV negativos; sin embargo resultó notable que ninguno de estos pacientes falleció durante el periodo del estudio. Las variables que se asociaron a mayor MRT fueron las mismas en los pacientes que recibieron un acondicionamiento convencional o de intensidad reducida, sin embargo el impacto fue muy superior en el primero de los casos. La fase más avanzada de la enfermedad mostró una tendencia a mayor MRT.

Se ha postulado que el uso de acondicionamiento de intensidad reducida se podría asociar a elevado riesgo de progresión precoz de la enfermedad, sin embargo, el esquema de acondicionamiento usado en nuestro estudio incluyó fármacos con actividad citotóxica directa que aunque menor que los esquemas convencionales, puede explicar la ausencia de diferencias significativas en la probabilidad de recidiva precoz (*Kottaridis PD, 2000; Giralt S, 2001; Martino R, 2001; Slavin S, 1998*) Otros autores, con acondicionamientos de intensidad reducida similares, han observado también SLE prolongada en pacientes con enfermedades de alto riesgo (*McSweeney PA, 2001; Sorrow ML, 2004*). La probabilidad similar de recidiva, con menor MRT logró mejorar los resultados de SG en el grupo de Alo-TIR. Sin embargo, la presencia de algunas diferencias entre los dos tipos de acondicionamiento hicieron que una comparación directa de los resultados de SG no fuera posible. La primera de estas diferencias fue una mayor proporción de LMA y SMD en el grupo de acondicionamiento convencional (57% en el grupo de acondicionamiento convencional vs 22% en el de intensidad reducida) y un menor periodo de seguimiento en el grupo de intensidad reducida (28 meses en el grupo de acondicionamiento convencional vs. 14 meses en el de intensidad reducida; $P < 0.001$). Estos factores podrían reducir la probabilidad de recidiva en el Alo-TIR, por lo que eran necesarios otros estudios en enfermedades específicas para valorar el verdadero efecto que tiene el acondicionamiento de intensidad reducida sobre la SG y la recidiva. En trabajos posteriores al aquí discutido, se ha demostrado que el uso de acondicionamiento de intensidad reducida se asocia a mayor riesgo de recidiva en pacientes con SMD y LMA, en comparación con el

acondicionamiento convencional (*Martino R, 2006; Aoudjhane M, 2005*). Además dentro de los acondicionamientos de intensidad reducida también se ha demostrado que los esquemas con menor capacidad antileucémica se asocian a mayor riesgo de recidiva (*De Lima, 2004*) Esta diferencia en la recidiva no se traduce en menor SG, ya que se compensa por la menor MRT, de forma que que la SG y la SLE son similares en ambos grupos (acondicionamiento convencional vs Intensidad reducida), como se puede ver en la **Figura 9**. Por otra parte, se ha de tener en cuenta que los pacientes que recibieron acondicionamiento de intensidad reducida se consideraron no candidatos a un trasplante convencional, por lo que esta última opción no se contempló en la práctica clínica (*Martino, 2006*).

Figura 9: Comparación de mortalidad relacionada con el tratamiento y recidiva en pacientes con SMD de alto riesgo.



Tomada de: *Martino, R. 2006*

Una pregunta que no respondió nuestro trabajo fue si el uso de Alo-TIR en pacientes no candidatos a trasplante convencional es mejor que otras estrategias como quimioterapia o trasplante autólogo. Un trabajo unicéntrico, que incluyó pacientes con LMA de alto riesgo en primera RC comparó los pacientes que disponían de un donante HLA idéntico familiar vs. pacientes sin donante familiar. El 71% de los pacientes con donante pudo recibir el Alo-TIR. La mayor MRT del grupo de donante (12%) fue ampliamente compensada con una reducción en la recidiva (12% vs 54%; $P=0.0002$) y se tradujo en mejores resultados en el grupo con donante vs. sin donante, tanto en términos de SG ($P=0.04$) como de SLE (54% vs

30%; $P=0.001$) (*Mohty M, 2005*). Estos datos refuerzan el papel del trasplante alogénico en la LMA de alto riesgo, incluso en pacientes de edad avanzada o con comorbilidades.

Para establecer el mejor acondicionamiento en un paciente en concreto, se ha preconizado el uso de índices de comorbilidad que permiten predecir el riesgo de MRT precoz. En este sentido, en los últimos años se ha asentado el índice de comorbilidad de Sorror para predecir MRT y SG en pacientes que han recibido un trasplante alogénico (*Sorror M, 2005*). Este índice permite identificar los pacientes que pueden recibir un acondicionamiento convencional con un riesgo de MRT aceptable, y así beneficiarse del mayor poder antileucémico de las dosis altas de quimioterapia y/o radioterapia. Por otra parte, los pacientes con índices de comorbilidad elevados, por lo tanto con elevado riesgo de MRT precoz, se beneficiarían de los esquemas de intensidad reducida, sin tanta capacidad antileucémica pero que ofrecen también la posibilidad de curación mediante el efecto del injerto contra el tumor (*Sorror M, 2010*).

En nuestro trabajo, los pacientes en el grupo de intensidad reducida tuvieron una tendencia a menor incidencia de EICR aguda que los pacientes que recibieron acondicionamiento convencional. En otros estudios la incidencia de EICR aguda ha sido muy variable; algunos trabajos sugieren una menor incidencia de EICR aguda, mientras otros indican que es similar o incluso mayor que tras acondicionamiento convencional. Las diferencias se pueden atribuir a las distintas profilaxis de la EICR y al uso tanto de donantes emparentados como no emparentados en los diferentes estudios. La menor incidencia de EICR aguda puede explicarse por la menor liberación de citoquinas proinflamatorias como se había sugerido en trabajos previos (*Ferrara J, 1999; Perez-Simon JA, 2003*). Por otro lado, es importante remarcar que en nuestro estudio el 45% de los pacientes habían recibido un trasplante con depleción de linfocitos T (mediante selección CD34+), lo que indudablemente reduce la incidencia de EICR aguda (*Ho VT, 2001; Urbano-Ispizua A, 2001*). De hecho, si se comparan sólo los pacientes sin depleción T, la incidencia de EICR aguda fue todavía mayor en el grupo de acondicionamiento convencional. La mediana de aparición de la EICR aguda en el grupo de intensidad reducida fue mas tardía que tras acondicionamiento convencional, lo que podría reducir la

mortalidad al permitir una separación de la toxicidad relacionada con el acondicionamiento y la aparición de la EICR. Finalmente, no se observaron diferencias entre ambos grupos en relación con la EICR crónica, que se ha revelado como el factor más importante en el control de la enfermedad de base en otros trabajos (*Nagler A, 1999; Childs R, 1999; Mattsson J, 2001; Valcárcel D, 2003*)

En un trabajo centrado en el impacto del acondicionamiento en el desarrollo de EICR y que incluyó 238 pacientes (150 Alo-TIR y 88 acondicionamiento convencional), los resultados fueron similares a los de nuestro trabajo, con menor incidencia de EICR aguda en el grupo de Alo-TIR (44% vs 67%, $P < 0.001$). El acondicionamiento fue la única variable con impacto en el análisis multivariado; además, la aparición de EICR aguda fue más tardía en el Alo-TIR (37d vs 23d, $P < 0.001$). El uso de Alo-TIR se asoció a una tendencia a mayor EICR crónica (71% vs 63%, $P = 0.08$), a expensas de las formas limitadas (25% vs 7%, $P = 0.028$). Además, los pacientes del grupo de Alo-TIR tuvieron menor necesidad de inmunodepresión a los 36 meses (35.5 vs 68.8; $P = 0.028$) (*Perez-Simon, 2005*)

Estos estudios iniciales sobre EICR comparten un problema para su correcta interpretación, que es la definición de EICR aguda en función del momento temporal (antes del día +100 post-trasplante). De hecho la introducción de los Alo-TIR fue uno de los motivos que indujeron al cambio en la definición de EICR agudo según los criterios del NIH, de forma que desde el 2005, se acepta que puede aparecer EICR agudo más allá del día +100 (*Filipovich, 2005*). En trabajos posteriores al nuestro que ya incluyen estos criterios y comparan esquemas de intensidad reducida con convencionales, se observa que la incidencia de EICR agudo y crónico son similares, si bien, en general, se mantiene una aparición más tardía de EICR agudo en el grupo de Alo-TIR (*Johnston L, 2008*)

Como conclusión a este primer trabajo, encontramos que la introducción de los esquemas de intensidad reducida en nuestro programa de trasplante permitió reducir la MRT sin aparente incremento de la recaída, lo que conllevó en conjunto a una mejoría de la SG. Por lo tanto, el principal objetivo de estos esquemas de intensidad reducida, la reducción de la mortalidad precoz, se ha visto cumplido. En

futuros estudios se desarrollarán mejoras en estos esquemas y se analizarán los resultados en enfermedades concretas.

Sobre el segundo trabajo de la Tesis.

Los trabajos iniciales en torno al Alo-TIR mostraron que los esquemas lograban un injerto precoz y estable en el tiempo y que lograban reducir la MRT en las fases precoces post-trasplante. Se planteó como siguiente cuestión investigar si el EICL en este contexto era suficiente para lograr la curación de pacientes de alto riesgo, incluidos los pacientes que habían recidivado después de un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos. En concreto, nosotros decidimos centrarnos en el papel del Alo-TIR en los pacientes con LMA y SMD de alto riesgo, que en muchos casos se descartaban para un trasplante convencional por motivos de edad, comorbilidades o por un trasplante previo. Se había intentado analizar este aspecto en un trabajo anterior de revisión de un gran número de estudios de diversos grupos. La disparidad de enfermedades, el uso de diferentes esquemas de acondicionamiento y los diferentes tipos de donantes hacían difícil hasta la fecha extraer conclusiones. De hecho, los diversos estudios mostraban resultados muy diferentes, con MRT que oscilaba entre el 5% y 51%, recidivas entre el 11% y 45%, SG entre el 17% y 65% y SLE entre el 31% y 80%. (*Martino R 2002; Lazarus HM, 2006; Schmid C, 2005; Sayer HG, 2003; Hallemeier C, 2004; Hegembart U, 2006; Platzbeker U, 2006*)

Nuestro trabajo trató de superar esas limitaciones al establecer unos criterios de inclusión concretos y estrictos:

- 1) Pacientes con patologías concretas, en este caso LMA y SMD de alto riesgo
- 2) Mismo acondicionamiento y mismo tipo de donante (hermanos HLA idéntico)
- 3) Seguimiento prolongado que permitió por primera vez el análisis de la evolución de estos pacientes a largo plazo, y estudiar la capacidad antileucémica del trasplante
- 4) Diseño prospectivo y multicéntrico que permita la extrapolación de los resultados a otros centros.

El hallazgo fundamental de este segundo trabajo fue identificar la EICR crónica como el principal factor asociado con una reducción de la recidiva de la LMA y SMD. Además, la EICR crónica no se asoció a mayor MRT, por lo que también fue el factor más importante asociado a mejores SG y SLE a los 4 años. Ello a diferencia de la EICR aguda, donde el efecto beneficioso en términos de reducción de las recidivas se ve contrarrestado por una mayor MRT y en el balance final no es positivo en términos de SG o SLE.

En nuestro estudio, igual que en otras publicaciones anteriores (*Martino R, 2006, Shimoni A, 2006*), la principal causa de fracaso del procedimiento fue la recidiva de la enfermedad de base. La recidiva tiende a producirse en la fase precoz post-trasplante (mediana de 4 meses en nuestro trabajo) y por lo tanto sin dar tiempo a que se establezca un EICL estable y potente (*Mattsson J, 2001B*). La plataforma para que se pueda desarrollar este EICL se basa en el establecimiento de un quimerismo completo de linfocitos T del donante, hecho que se produce a partir del día +100 post-trasplante, tal y como habíamos demostrado en el estudio previo que forma parte de la tesis en forma de **Anexo 1**. Por otra parte, la mayoría de los pacientes que recayeron se encontraban bajo tratamiento inmunodepresor, lo que también podría dificultar el establecimiento del EICL. La mejora de los resultados globales pasarían por lo tanto por reducir la la recidiva postrasplante y en este sentido se pueden proponer varias estrategias, entre ellas las siguientes:

1. Una reducción más rápida de la inmunodepresión farmacológica post-trasplante, para permitir la adquisición temprana de quimerismo completo de linfocitos T del donante y un EICL precoz. Esta estrategia conlleva mayor riesgo de EICR aguda grave y fue probado por el grupo de Seattle sin éxito (*Feinstein LC, 2003*).
2. Uso de fármacos antineoplásicos en la fase precoz postrasplante hasta que se produzca el EICL. En este sentido, se evalúa actualmente la azacitidina post-trasplante. Hasta el momento sólo se dispone de datos preliminares de un estudio de búsqueda de dosis en el que se determinó que el uso de 5-azacitidina en dosis de 50 mg/m²/día durante 5 días, cada 28 días a partir del día +40 post-trasplante resultó segura y se pudo administrar durante 4 ciclos. Aunque el estudio no estaba diseñado para evaluar eficacia, es destacable la SG

del 77% y la SLE del 58% a un año en pacientes de alto riesgo lo que sugiere que la estrategia puede ser beneficiosa y merece estudios adicionales (*De Lima, 2010*)

En nuestra serie la MRT fue baja (8% a los 100 días y 16% al año) y por lo tanto se logró el objetivo inicial. Dado que la mayor parte de los fallecimientos debidos a MRT fueron en relación con la EICR, una opción sería el uso de alemtuzumab in vivo para atenuar el riesgo de EICR aguda (*Ho AY, 2004*). Esta estrategia supondría también un mayor riesgo de infecciones y una reducción de la EICR crónica, el factor más importante en la evolución de los pacientes en nuestra serie. En este sentido, se han publicado resultados de un estudio de desescalado de dosis de alemtuzumab; partiendo de los 100 mg/día iniciales se realizaron varios grupos de pacientes con diferentes combinaciones de dosis y días de administración, en el contexto de un Alo-TIR con fludarabina (150 mg/m²) y melfalán (140 mg/m²) con CsA como profilaxis de EICR. Este trabajo mostró que una dosis de 30 mg/día el día -1 mantenía una buena capacidad de evitar EICR aguda y a la vez lograba una mejor reconstitución inmune (*Chakraverty R, 2010*).

La capacidad citotóxica de la quimioterapia de acondicionamiento también parece tener un papel destacable en la prevención de recidivas (*Clift RA, 1990; Anderson BS, 2002; de Lima M, 2004; Martino R, 2006, Shimoni A, 2006*) En un grupo de 18 pacientes con LMA en primera RC que recibieron un Alo-RIC con fludarabina (90 mg/m²) e irradiación corporal total (200 Cgy), *Feinstein y colaboradores (Feinstein LC, 2003)* observaron 10 muertes debidas a progresión de la leucemia tras una mediana de 198 días y una MRT del 16% al año. En nuestro trabajo, la incidencia de recidiva fue del 29%, comparativamente baja lo que en parte se puede explicar por la mayor intensidad del acondicionamiento.

El uso de ILD como tratamiento de las recidivas de LMA o SMD tras trasplante alogénico convencional ofrecen en general una eficacia muy limitada (*Levine JE, 2002; Porter D, 2006*). En nuestra serie, con una experiencia limitada (11 pacientes) la ILD fue eficaz en una minoría de casos. Sin embargo, es de remarcar que dos pacientes tratados con ILD en recidiva precoz (una molecular y otra citogenética) alcanzaron una remisión prolongada. Por el contrario sólo 3 de los 9

pacientes que recibieron la ILD en recidiva hematológica obtuvieron una RC. Estos datos sugieren que el uso precoz de la ILD con baja carga tumoral (detectada por citometría de flujo, biología molecular o estudios citogenéticos como FISH) En la práctica, la ILD en estas fases es todavía de aplicabilidad incierta. Marks y colaboradores (*Marks DI, 2002*) describieron sus resultados, principalmente tras Alo-RIC con depleción T, (bien con alemtuzumab o con selección CD 34 positiva) en diversas neoplasias hematológicas. Ellos mostraron que alcanzar una remisión dependió del desarrollo de EICR aguda y/o crónica, lo que concuerda con nuestros resultados que indican que la EICR crónica fue el factor más importante para prolongar la SLE y la SG.

Entre los marcadores de recidiva precoz se pueden destacar tres:

- 1) La citometría de flujo: En un trabajo que incluyó 41 pacientes con LMA o SMD que recibieron un trasplante alogénico, la determinación de la enfermedad mínima residual (EMR) en el día +100 del trasplante mediante citometría de flujo diferenció, con un punto de corte en 10^{-3} , dos grupos de pacientes según su riesgo de recidiva. Comparando a los 4 años, los pacientes con una EMR en el día +100 inferior a 10^{-3} vs. superior a 10^{-3} se observó una SLE del 74% vs 17% ($P=0.01$) y SG del 73% vs 25% ($P=0.002$), respectivamente. En el análisis multivariado, las variables con impacto pronóstico fueron el nivel de EMR y el desarrollo de EICR crónica (*Diez-Campelo, 2009*).
- 2) Marcadores moleculares, entre los cuales el gen del Wilms Tumor 1 (WT-1) es el que más se ha estudiado: Este marcador se encuentra sobre-expresado en la mayoría de las LMA y SMD (*Cilloni, 2004*) y es un marcador en diversos momentos tras el tratamiento inicial de la LMA (*Cilloni, 2009*) En una experiencia limitada en pacientes con LMA y SMD, receptores de un Alo-TIR, la persistencia de carga baja de WT1 se asoció a menor riesgo de recidiva; además, la elevación de las copias de WT1 precedió a la recidiva citológica y en un 50% de los casos a la pérdida de quimerismo, lo que sugiere que la determinación seriada de WT1 después del trasplante podría ser útil para predecir la recidiva (*Candoni A, 2011*) Resultados similares se habían reportado previamente en el contexto de trasplante con acondicionamiento convencional en leucemia aguda y SMD (*Ogawa H,*

2003), así como en el tratamiento de inducción de la LMA (Weisser M, 2005); de hecho es una de las técnicas que se han recomendado en el NCI First International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (Kroger N, 2010)

- 3) La determinación de quimerismo de células CD34 en médula ósea: El estudio de quimerismo en células CD34+ puede ser útil para predecir la recidiva de SMD y LMA después de trasplante alogénico, tanto en el trasplante convencional (Bornhauser M, 2009) como en de intensidad reducida (Al-Ali HK, 2006). Este análisis puede utilizarse para tomar decisiones como la retirada de la inmunodepresión o la ILD (Zeiser R, 2005) En un trabajo reciente sobre Alo-TIR en pacientes con LMA y SMD, el quimerismo en células CD34+ <90% o un descenso >5% en el mismo tuvo una sensibilidad para predecir la recidiva en los 28 días siguientes de un 62% y 71%, respectivamente (Lange T, 2011) En este mismo trabajo la combinación de quimerismo CD34+ y expresión de WT1 tuvo una sensibilidad del 79% para predecir la recidiva en las 4 semanas siguientes.

La incidencia elevada de recidivas cuando no apareció EICR crónica podría justificar la ILD profiláctica en estos pacientes. Sin embargo, ya que una proporción de ellos desarrollaría EICR crónica extensa, es de suma importancia seleccionar adecuadamente los candidatos potenciales a esta intervención. La ILD profiláctica podría recomendarse en pacientes de muy alto riesgo, donde asumir el riesgo de EICR crónica extensa podría ser aceptable, ya que ante una recaída post-trasplante las medidas terapéuticas son de muy escasa utilidad.

En conclusión nuestro trabajo demostró que el Alo-TIR en pacientes con LMA y SMD de alto riesgo permite una remisión prolongada de la enfermedad (y posiblemente su curación), lo que apoya realizar más estudios en este contexto cuando los pacientes no son candidatos a trasplante convencional. Nuestro trabajo mostró por primera vez que el desarrollo de EICR crónica tras Alo-TIR no sólo reduce la recidiva de la enfermedad, sino que es el factor más importante para mejorar la SLE y la SG. A pesar de ello, los pacientes de muy alto riesgo requieren todavía nuevas estrategias que reduzcan todavía más las recidivas post-trasplante.

Sobre el tercer trabajo de la Tesis.

En el tercer trabajo de la presente tesis comparamos dos estrategias de Alo-TPH que intentan reducir la MRT. Antes de la aparición de los Alo-TIR, una de las formas de reducir la mortalidad precoz era la depleción de linfocitos T mediante separación de estos o la selección positiva de células CD34+. Si con esta última técnica se ajusta la cantidad de células CD3 a $3 \times 10^5/\text{kg}$ se reduce la EICR aguda y crónica a la vez que se mantiene su capacidad para lograr injerto hematopoyético a largo plazo (*Urbano-Ispizua A, 2001*) En pacientes mayores de 50 años, la selección positiva era de aplicación limitada, al requerir dosis altas de quimioterapia y/o radioterapia que conlleva una elevada toxicidad y MRT. Ya que el Alo-TIR se había mostrado útil en pacientes con LMA y SMD mayores de 45 años, con alto riesgo de MRT precoz, en este tercer trabajo nos propusimos comparar las dos estrategias, con la hipótesis de que con Alo-TIR se obtendrían resultados similares a los de la selección positiva de CD34+.

En nuestro trabajo pudimos confirmar como el uso de acondicionamientos de intensidad reducida fue capaz de revertir el impacto negativo de la edad avanzada en el post-trasplante temprano en pacientes con LMA y SMD de alto riesgo en fase precoz. Es destacable que este trabajo se realizó de forma prospectiva, con una selección del tratamiento que se determinó únicamente en base a la edad, de forma que los pacientes hasta 50 años recibieron un Alo-TPH con acondicionamiento convencional y selección positiva de células CD34, mientras que los pacientes mayores de 50 años recibieron un Alo-TIR. Este tipo de estudios de una única institución que comparan dos estrategias de trasplante limitan los sesgos vinculados al efecto centro (*Gray R, 1991*). Además, el análisis se realizó por intención de tratamiento para evitar interpretaciones erróneas (*Newell DJ, 1992*) ya que han surgido dudas sobre el verdadero impacto de los Alo-RIC en los pacientes de edad avanzada; ello se debe a posibles sesgos de selección de los trasplantados puesto que sólo llegan al procedimiento los pacientes de edad avanzada con mejor estado general.

Este trabajo mostró similar SLE y SG a los 4 años en el análisis por intención de tratamiento en los dos grupos. Por tanto, el Alo-TIR se puede proponer a pacientes de edad avanzada con LMA y SMD. Otras fortalezas del estudio son la inclusión de pacientes de muy alto riesgo con seguimiento prolongado, 4 años de mediana, así como la homogeneidad en lo relativo al tipo de donante y la fuente de progenitores y el régimen de acondicionamiento en cada cohorte.

El tratamiento asignado pudo realizarse en el 83% de los pacientes mayores de 50 años y en el 88% de los pacientes menores de 50 años, lo que reafirma su aplicabilidad en pacientes con LMA de alto riesgo. Nuestros resultados contrastan con los del MD Anderson que en un estudio similar mostraron que solo una minoría de pacientes con LMA llegaron al trasplante alogénico; así, en su experiencia en el subgrupo de pacientes con donante identificado en primera remisión completa sólo 13 de 21 pacientes se trasplantaron (*Estey E, 2007*). Los grupos de pacientes son similares en su estudio y en el nuestro, pero es posible que los diferentes condicionantes del sistema en España y Estados Unidos hayan influido en la diferente aplicabilidad del trasplante .

Por otro lado, los puntos débiles del presente estudio fueron la muestra reducida de pacientes en cada uno de los grupos y las diferencias inherentes a la edad sobre las características biológicas de las LMA y SMD. Por este último motivo sólo se analizó en detalle la MRT. También, podría haber centros que discreparan sobre el esquema de acondicionamiento usado en cada uno de los grupos. En cualquier caso, las dos estrategias se habían mostrado eficaces en estudios de un solo brazo de nuestro centro, motivo por el que decidimos mantenerlas a lo largo del estudio. La tendencia a mayor MRT en pacientes de edad cercana a los 50 años que recibieron un trasplante convencional con selección CD34+ y la escasa MRT observada en los receptores de acondicionamiento de intensidad reducida, concuerdan con estudios previos. Ello indica que el Alo-TIR reduce la MRT en pacientes de edad avanzada. Por otro lado, la mayor mortalidad de los pacientes con índice de comorbilidad elevado en ambos grupos también confirma estudios previos, lo que apoya que para definir el riesgo de mortalidad es mejor considerar las comorbilidades y no tanto la edad (*Sorror M, 2005*)

En resumen, esta experiencia unicéntrica en pacientes con LMA y SMD demuestra que la elevada MRT esperable en pacientes de edad avanzada puede evitarse con el uso de acondicionamientos de intensidad reducida y que se aproxime a la observada en pacientes más jóvenes receptores de un Aío-TPH convencional de hermano HLA idéntico. Nuestro trabajo no fue suficientemente amplio como para evaluar el impacto del acondicionamiento en otros indicadores post-trasplante, para lo que serían necesarios estudios con mayor número de pacientes y de carácter multicéntrico.

Próximos pasos

Los trabajos que conforman la Tesis Doctoral han investigado diversos aspectos importantes en el contexto del Alo-TIR, con especial énfasis en las LMA y los SMD. Inicialmente se demostró la capacidad de lograr el injerto con esquemas de intensidad reducida y también su capacidad para reducir la MRT en pacientes con alto riesgo de toxicidad del procedimiento. En una segunda fase confirmamos que estos esquemas son capaces de lograr la curación en algunos pacientes y con unos resultados similares a los obtenidos con los esquemas convencionales en pacientes más jóvenes.

Los resultados no son todavía óptimos ya que la supervivencia global a largo plazo es de alrededor del 50%. Los principales problemas que se asocian al AloTIR no difieren de los que se presentan con acondicionamiento convencional:

- La principal causa de fracaso es la recidiva de la enfermedad, con una incidencia en torno al 30%.
- El segundo motivo de fallo del tratamiento es la mortalidad asociada al procedimiento, que si bien es menor de la esperable con acondicionamiento convencional, es todavía más elevada de lo que se podría considerar aceptable y está en torno al 25% a largo plazo, cuya principal causa es la EICR.

Los siguientes pasos para mejorar los resultados han de ir por lo tanto encaminados a mejorar estos problemas y estos trabajos formarán parte de la continuación de la línea de investigación los próximos años.

Para reducir la recidiva se pueden plantear tres estrategias:

1. Intensificar el acondicionamiento con agentes con capacidad antileucémica y escasa toxicidad extra-hematológica. En este sentido se pueden plantear agentes ya conocidos como tiotepa y/o azacitidina pretrasplante, de escasa toxicidad, que podrían reducir la recidiva precoz sin incrementar la MRT.

2. Uso de fármacos en el post-trasplante precoz. El agente que se está investigando actualmente por diversos grupos es de nuevo la azacitidina, cuya actividad antileucémica, aunque modesta, podría ser suficiente para controlar la enfermedad en los primeros meses post-trasplante hasta que se establezca el EICL.
3. El uso de ILD en pacientes con persistencia de enfermedad residual, antes de una recidiva franca.

Posiblemente se puedan combinar estas estrategias con el objetivo de mejorar los resultados.

La reducción de la MRT es otro gran objetivo y para ello se podrían usar diferentes estrategias:

1. Aplicación de los índices de comorbilidad para ajustar el acondicionamiento al máximo.
2. Esquemas inmunodepresores más eficaces que reduzcan la EICR grave. En estos momentos la combinación de un inhibidor de calcineurina y rapamicina (un agente anti mTOR) se está estudiando activamente con resultados prometedores.
3. Identificación de marcadores precoces de EICR para un tratamiento anticipado. En la actualidad se han identificado marcadores mediante técnicas de proteómica que podrían ser aplicables en este sentido.

Conclusiones

Las conclusiones de los estudios que forman esta tesis doctoral son:

1.- El Alo-TIR aquí investigado logra el injerto hematopoyético y un quimerismo completo del donante de forma temprana (antes de los 6 meses) y estable.

2.- El Alo-TIR reduce la MRT en pacientes que no son candidatos a Alo-TPH con acondicionamiento convencional, lo que les ofrece el beneficio potencial del efecto injerto contra tumor.

3.- El desarrollo de EICR crónica, como marcador de EICT, es el factor más importante para reducir las recidivas y para mejorar la SG en los pacientes con LMA y SMD receptores de un Alo-TIR.

4.- En pacientes de edad avanzada, el Alo-TIR permite obtener resultados similares a los observados en pacientes más jóvenes receptores de un Alo-TPH con acondicionamiento en dosis alta y selección de células CD34 positivas.

5.- Como resultado de las conclusiones anteriores se desprende que el Alo-TIR es una opción curativa para pacientes con riesgo elevado de MRT con el trasplante convencional y que el beneficio fundamental se obtiene mediante el desarrollo del EICT.

Bibliográfia

- 1) Al-Ali HK, Nehring C, Krahl R, Becker C, Leiblein S, Edelmann J et al. Donor CD34+ cell chimerism at day 28 and chronic graft- versus-host disease (GvHD) but not high-risk cytogenetics influence outcome of allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT) following reduced intensity conditioning (RIC) in patients with AML and MDS. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2006; 108: 547.
- 2) AML collaborative group. A systematic collaborative overview of randomized trials comparing idarubicin with daunorubicin (or other anthracyclines) as induction therapy for acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology* 1998; 103:100-109.
- 3) Andersson BS, Thall PF, Madden T, et al: Busulfan systemic exposure relative to regimen- related toxicity and acute graft-versus-host disease: Defining a therapeutic window for i.v. BuCy2 in chronic myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002, 8:477-485.
- 4) Antin JH, Childs R, Filipovich AH et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 tandem meetings. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7: 473–485.
- 5) Aoudjhane M, Labopin M, Gorin NC, et al. 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.
- 6) Appelbaum F.R, Gundacker H, Head D.R. et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood* 2006;107:3481-3485.
- 7) Appelbaum F.R, Pearce FR SF: Hematopoietic cell transplantation in first complete remission versus early relapse. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; 19: 333-339.
- 8) Arber D. A, Brunning R.D, Le Beau M.M. et al. Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities. In Swerdlow S.H, Campo E, Harris N.L et al

- (Eds). World Health Organization Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon 2008 (a).
- 9) Arber D. A, Brunning R.D, Orazi A. et al. Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes. In Swerdlow S.H, Campo E, Harris N.L et al (Eds). World Health Organization Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon 2008 (b).
 - 10) Arber D. A, Brunning R.D, Orazi A. et al. Acute myeloid leukemia not otherwise specified. In Swerdlow S.H, Campo E, Harris N.L et al (Eds). World Health Organization Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon 2008 (c).
 - 11) Arber D. A, Brunning R.D, Le Beau M.M. et al. Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities. In Swerdlow S.H, Campo E, Harris N.L et al (Eds). World Health Organization Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon 2008 (b).
 - 12) Arlin Z.A, Case D.C, Moore J et al. Randomized multicenter trial of cytosine arabinoside with mitoxantrone or daunorubicine in previously untreated adult patients with acute nonlymphocytic leukemia (ANLL). Lederle Cooperative Group. *Leukemia* 1990; 4: 177-183.
 - 13) Aul C, Gattermann N, Heyll A, Germing U, Derigs G, Schneider W. Primary myelodysplastic syndromes: analysis of prognostic factors in 235 patients and proposals for an improved scoring system. *Leukemia*. 1992; 6:52-9.
 - 14) Balducci L. Transfusion independence in patients with myelodysplastic syndromes: Impact on outcome and quality of life. *Cancer* 2006; 106:2087-2094.
 - 15) Baldus B.C, Mrozek K, Marcucci G et al. Clinical outcome of the novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: A concise review. *British Journal of Haematology* 2007; 137: 387-400.
 - 16) Barnes DWH, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE. Treatment of murine leukemia with X-rays and homologous bone marrow. Preliminary communication. *Br Med Journal* 1956, 2:626-7
 - 17) Bellamy WT, Richter L, Sirjani D, et al. Vascular endothelial cell growth factor is an autocrine promoter of abnormal localized immature myeloid precursors

- and leukemia progenitor formation in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2001;97:1427-34.
- 18) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. 1985;103:620-625.
 - 19) Bennett JM and MDS Foundation's Working Group on Transfusional Iron Overload. Consensus statement on iron overload in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol*. 2008; 83:858–61.
 - 20) Bernasconi P, Klersy C, Boni M et al. World Health Organization classification in combination with cytogenetic markers improves the prognostic stratification of patients with de novo primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2007; 137:193-205.
 - 21) Bertz H, Potthof K, Finke J. Allogeneic stem-cell transplantation from related and unrelated donors in older patients with myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2003, 21: 1480-1484.
 - 22) Bishop J.F, Matthews K.J, Young G.A et al. A randomized study of high dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia. *Blood* 1996; 87: 1710-1717
 - 23) Bishop J.F, Lowenthal R, Joshua D et al. Etoposide in leukemia. *Cancer* 1991; 67:285-91.(a)
 - 24) Bishop J.F. Etoposide in the management of leukemia: A review. *Seminars in Oncology* 1991; 18:62.29.(b)
 - 25) Bloomfield C.D, Lawrence D, Bird J.C et al. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukaemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Research* 1998, 58:4173-4179.
 - 26) Bornhauser M, Oelschlaegel U, Platzbecker U, Bug G, Lutterbeck K, Kiehl MG et al. Monitoring of donor chimerism in sorted CD34+ peripheral blood cells allows the sensitive detection of imminent relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2009; 94: 1613–1617.
 - 27) Brunning R.D, Orazi A, Germing U. Myelodysplastic syndromes/neoplasma, overview. In Swerdlow S.H, Campo E, Harris N.L et al (Eds). *World Health Organization Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press: Lyon 2008

- 28) Bullinger L, Dohner K, Bair E, Frohling S, Schlenk RF, Tibshirani R, Dohner H, Pollack JR Use of Gene-Expression Profiling to Identify Prognostic Subclasses in Adult Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350:1605-1616.
- 29) Burnett AK, Wheatley AH, Goldstone RF et al. The value of allogeneic bone marrow transplant in patients with acute myeloid leukaemia at differing risk of relapse: results of the UK MRC AML10 Trial. *Br J Haematol* 2002;118: 385–400.
- 30) Burnett AK, Hills RK, Milligan D, Kjeldsen L, Kell J, Russell NH, Yin JA, Hunter A, Goldstone AH, Wheatley K. Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRC AML15 trial. *J Clin Oncol* 2011 Feb 1;29(4): 369-77
- 31) Byrd J.C, Dodge J.K, Carroll A, et al. Patients With t(8;21)(q22;q22) and Acute Myeloid Leukemia Have Superior Failure-Free and Overall Survival When Repetitive Cycles of High-Dose Cytarabine Are Administered. *Journal of Clinical Oncology* 1999;17: 3767-3775
- 32) Byrd J.C, Ruppert A.S, Mrózek k et al. Repetitive Cycles of High-Dose Cytarabine Benefit Patients With Acute Myeloid Leukemia and inv(16) (p13q22) or t(16;16)(p13;q22): Results from CALGB 8461 2004; 22: 1087-1094.
- 33) Candoni A, Toffoletti E, Gallina R, Simeone E, et al. Monitoring of minimal residual disease by quantitative WT1 gene expression following reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia. *Clin Transplant*. 2011 Mar-Apr;25(2):308-16.
- 34) Carella AM, Champlin R, Slavin S et al. Mini-allografts: ongoing trials in humans (editorial). *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 345–350. (A)
- 35) Carella AM, Giralt S, Slavin S. Low intensity regimens with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as treatment of hematologic neoplasia. *Haematologica* 2000; 85: 304–313. (B)
- 36) Cassileth P.A, Harrington D.P, Hines J.D, et al Maintenance chemotherapy prolongs remission duration in adult acute nonlymphocytic leukaemia. *Journal of Clinical Oncology* 1988; 6: 583-587.

- 37) Castaigne S, Pautas C, Terré C et al. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. 2012 Apr 21;379(9825):1508–16.
- 38) Chakraverty, R., Orti, G., Roughton, M., Shen, J., Fielding, A., Kottaridis, P., Milligan, D., et al. Impact of in vivo alemtuzumab dose before reduced intensity conditioning and HLA-identical sibling stem cell transplantation: pharmacokinetics, GVHD, and immune reconstitution. *Blood* 2010; 116(16), 3080–3088.
- 39) Chakraverty, R, Peggs K, Chopra R et al. Limiting transplantation-related mortality following unrelated donor stem cell transplantation by using a nonmyeloablative conditioning regimen. *Blood* 2002; 99:1071-8.
- 40) Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM et al. Blood stem cells compared with bone marrow transplantation as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. *Blood* 2000; 95, 3702–3709.
- 41) Childs R, Clave E, Contentin N et al. Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood* 1999; 94: 3234–3241.
- 42) Cilloni D, Gottardi E, Francesca Messa F, et al. Significant Correlation Between the Degree of WT1 Expression and the International Prognostic Scoring System Score in Patients With Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol* 2003; 21:1988-1995.
- 43) Cilloni D, Saglio G. WT1 as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol* 2004; 112: 79–84.
- 44) Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5195–5201.
- 45) Clift RA, Buckner CD, Appelbaum FR, et al: Allogeneic marrow transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first remission: A randomized trial of two irradiation regimens. *Blood* 1990, 76:1867-1871.

- 46) Cobbold SP, Martin G, Quin S, Waldman H. Monoclonal antibodies to promote marrow engraftment and tissue graft tolerance. *Nature* 1986;323:164-166.
- 47) Colson YL, Wren SM, Schubert MJ et al. A nonlethal conditioning approach to achieve durable multilineage mixed chimerism and tolerance across major, minor and hematopoietic histocompatibility barriers. *J Immunol* 1995; 155:4179-4188
- 48) Colson YL, Li H, Boggs SS, Pattrene KD, Johnson PC, Odstad ST. Durable mixed allogeneic chimerism and tolerance by a nonlethal radiation-based cytoreductive approach. *J Immunol* 1996; 157:2820-2829.
- 49) Cornelissen J.J , van Putten W.L.J, Verdonck L.F, et al. Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? *Blood*, May 2007; 109: 3658 - 3666.
- 50) Couriel DR, Saliba RM, Giralt S, et al. Acute and chronic graft-versus-host disease after ablative and non- myeloablative conditioning for allogeneic hematopoietic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; 10:178–185.
- 51) Cutler CS, Stephanie J. Lee, Peter Greenberg, et al. A decisión análisis of allogeneic bone marrow transplantation for the myelodysplastic syndromes. Delayed transplantation for the low-risk myelodysplasia is associated with improved outcome. *Blood* 2004; 104:579-585.
- 52) Damaj G, Duhamel A, Robin M, et al. Impact of Azacitidine Before Allogeneic Stem-Cell Transplantation for Myelodysplastic Syndromes: A Study by the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie-Cellulaire and the Groupe-Francophone des Myelodysplasies. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30(36): 4533–40.
- 53) Diaconescu R, Flowers CR, Storer B, Sorrow ML, Maris MB, Maloney DG, Sandmaier BM, Storb R. Morbidity and mortality with nonmyeloablative compared to myeloablative conditioning before hematopoietic cell transplantation from HLA matched related donors. *Blood* 2004;104:1550–1558.

- 54) Estey E.H. Therapeutic options for acute myelogenous leukemia. *Cancer* 2001; 92:1059-1073.
- 55) Estey E.H. Thall P.F Cortes J.E et al. Comparison of idarubicine+ara-C, fludarabine+ ara-C, and topotecan+ara-C based regimens in treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia, refractory anemia with excess blasts in transformation or refractory anemia with excess blasts. *Blood* 2001;98: 3575-3583.
- 56) Elihu Estey, Marcos de Lima, Raoul Tibes, Sherry Pierce, Hagop Kantarjian, Richard Champlin, and Sergio Giralt. Prospective feasibility analysis of reduced-intensity conditioning (RIC) regimens for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in elderly patients with acute myeloid leukemia (AML) and high-risk myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood* 2007 vol. 109 (4) pp. 1395-1400
- 57) Extreman M, Overcash, Lyman GH, Parr J and Balducci L. Comorbidity and functional status are independent in older cancer patients. *J Clin Oncol* 1998: 1582-1587.
- 58) de Lima M, Anagnostopoulos A, Dunsel M, et al. 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
- 59) de Lima, M., Giralt, S., Thall, P. F., de Padua Silva, L., Jones, R. B., Komanduri, K., Braun, T. M., et al. Maintenance therapy with low-dose azacitidine after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for recurrent acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Cancer* 2010; 116(23), 5420–5431.
- 60) de Lima M, Giralt S. Allogeneic transplantation for the elderly patient with acute myelogenous leukaemia or myelodysplastic syndrome. *Semin Hematol* 2006; 43:107-117.
- 61) Díez-Campelo, M., Pérez-Simón, J. A., Pérez, J., Alcoceba, M., Richtmon, J., Vidriales, B., & San Miguel, J. Minimal residual disease monitoring after allogeneic transplantation may help to individualize post-transplant therapeutic strategies in acute myeloid malignancies *American journal of Hematology* 2009, 84(3), 149–152

- 62) Dreger P, Döhner H, Ritgen M et al. Allogeneic stem cell transplantation provides durable disease control in poor-risk chronic lymphocytic leukemia: long-term clinical and MRD results of the German CLL Study Group CLL3X trial. *Blood* 2010; 2010 116: 2438-244
- 63) Farag S.S, Ruppert A.S, Mrózek K, et al. Outcome of Induction and Postremission Therapy in Younger Adults With Acute Myeloid Leukemia With Normal Karyotype: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23: 482-493.
- 64) Fefer A, Sullivan KM, Weiden PL, et al. Graft versus leukemia effect in man. The relapse rate of acute leukemia is lower after allogeneic than after syngeneic marrow transplantation. In Truitt R, Gale RP Bortin MM editors. *Cellular Immunotherapy of Cancer*. New York: Alan R Liss; 1987. 401-408.
- 65) Feinstein LC, Sandmaier BM, Hegenbart U, et al: Non-myeloablative allografting from human leucocyte antigen-identical sibling donors for treatment of acute myeloid leukaemia in first complete remis- sion. *Br J Haematol* 2003; 120:281-288.
- 66) Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* 2009 Mar;10(3):223-32.
- 67) Fernandez H.F, Sun Z, Yao X et al. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukaemia. *New England Journal of Medicine* 2009; 361:1249-1259.
- 68) Ferrara JL, Levy R, Chao NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999;5:347–356.
- 69) Field, T., Perkins, J., Huang, Y., Kharfan-Dabaja, M. A., Alsina, M., Ayala, E., Fernandez, H. F., et al. (2018). 5-Azacitidine for myelodysplasia before allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 45(2), 255–260.
- 70) Filipovich, A., Weisdorf, D., Pavletic, S., Socie, G., Wingard, J., Lee, S., Martin, P., 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. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2005, 11(12), 945–956.

- 71) Garcia-Manero G, Yang H, Bueso-Ramos C, et al. Phase 1 study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid [SAHA]) in patients with advanced leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2008, 111: 1060 - 1066.
- 72) Gattermann N. Overview of guidelines on iron chelation therapy in patients with myelodysplastic syndromes and transfusional iron overload. *Int J Hematol* 2008 Jul;88(1):24-9.
- 73) Gatto S, Ball G, Onida F, et al Contribution of -2 microglobulin levels to the prognostic stratification of survival in patients with myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood* 2003; 102: 1622 - 1625.
- 74) Georgiou G, Karali V, Zouvelou C et al. Serial determination of FLT3 mutations in myelodysplastic syndrome patients at diagnosis, follow up or acute myeloid leukaemia transformation: incidence and their prognostic significance. *Br J Haematol* 2006; 134:302-306.
- 75) Germing U, Hildebrandr B, Pfeilstöcker M et al. Refinement of the international prognostic scoring system (IPSS) by including LDH as an additional prognostic variable to improve risk assessment in patients with primary myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia* 2005;19: 2223-2231.
- 76) Germing U, Strupp C, Kuendgen A et al. Prospective validation of the WHO proposals for the classification of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2006; 91:1596-1604.
- 77) Germing U, Strupp C, Kuendgen A et al. Refractory anemia with excess of blast (RAEB): analysis of reclassification according to the WHO proposals. *Br J Haematol* 2006; 132:162-167. Erratum in *Br J Haematol* 2006; 134:247
- 78) Giralt S, Estey E, Albitar M et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy. Harnessinggraft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 1997; 89: 4531–4536.
- 79) Giralt S, Thall PF, Khouri I, et al. 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.
- 80) Gotlib J; Lavori P; Quesada S; Stein RS;et al A Phase II intra-patient dose-escalation trial of weight-based darbepoetin alfa with or without granulocyte-

- colony stimulating factor in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol.* 2009;84(1):15-20.
- 81) Gray R, Wheatley K. How to avoid bias when comparing bone marrow transplantation with chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 1991; 7 (suppl 3): 9–12.
- 82) Greenberg P, Cox C, Le Beau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89: 2079–2088. *Blood* 1997; 89:2079-2088 Erratum in *Blood* 1998; 91:1100)
- 83) Greenberg, P., Sun, K., Miller, K., Bennett, J., et al. Treatment of myelodysplastic syndrome patients with erythropoietin with or without granulocyte colony-stimulating factor: results of a prospective randomized phase 3 trial by the Eastern Cooperative Oncology Group (E1996). *Blood* 2009, 114, 2393-2400.
- 84) Greenberg, P. L., Tuechler, H., Schanz, J., al. (2012). Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, 120(12), 2454–2465.
- 85) Grimwade D, Walker H, Oliver F et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: Analysis of 1612 patients entered into MRC AML 10 trial. *Blood* 1998, 92:2322-2333.
- 86) Grimwade, D., Hills, R. K., Moorman, A. V., et al. (2010). Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*, 116(3), 354–365.
- 87) Gyger M, Baron C, Forest L et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation has predictive value for the occurrence of irreversible graft failure and graft-vs-host disease. *Exp Hematol* 1998; 26: 426–434.
- 88) Harousseau J-L, Cahn J-Y, Pignon B, et al for the Groupe Ouest Leucemies Aigudes Myeloblastiques (GOELAM). Comparison of autologous bone marrow transplantation and intensive chemotherapy as postremission therapy in adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 1997; 90:2978- 2986.
- 89) Haferlach T. Molecular Genetic Pathways as Therapeutic Targets in Acute Myeloid Leukemia. *Hematology* 2008:400-411.

- 90) Haase D, Germing U, Schanz J et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007; 110: 4385-4395.
- 91) Hallemeier C, Girgis M, Blum W, et al: Out- comes of adults with acute myelogenous leukemia in remission given 550 cGy of single-exposure total body irradiation, cyclophosphamide, and unrelated donor bone marrow transplants. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; 10:310-319
- 92) Hegenbart U, Niederwieser D, Sandmaier BM, et al: Treatment for acute myelogenous leukemia by low-dose, total-body, irradiation-based conditioning and hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors. *J Clin Oncol* 2006; 24:444- 453
- 93) Hellstrom-Lindberg E; Gulbrandsen N; Lindberg G; et al. A validated decision model for treating the anaemia of myelodysplastic syndromes with erythropoietin + granulocyte colony-stimulating factor: significant effects on quality of life. *Br J Haematol* 2003 Mar;120(6):1037-46.
- 94) Ho VT, Soiffer RJ. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2001;98:3192–3204.
- 95) Ho AY, Pagliuca A, Kenyon M, et al: Reduced- intensity allogeneic hematopoietic stem cell trans- plantation for myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia using fludarabine, busulphan, and alemtuzumab (FBC) conditioning. *Blood* 2004; 104:1616-1623.
- 96) Horowitz, M. M., Gale, R. P., Sondel, P. M., Goldman, J. M., Kersey, J., Kolb, H. J., Rimm, A. A., et al. (1990). Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation *Blood*, 75(3), 555–562.
- 97) Itzykson, R., & Fenaux, P. (2009). Optimal sequencing of treatments for patients with myelodysplastic syndromes. *Current Opinion in Hematology* , 16, 77–83.
- 98) Itzykson, R., Thépot, S., Quesnel, B., & al, e. (2011). Prognostic factors for response and overall survival in 282 patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. *Blood* , 117, 403-411.

- 99) Jacobson LO, Marks EK, Robson MJ, Gaston EO, Zirkle RE. Effect of spleen protection on mortality following X-irradiation. *J Lab Clin Med* 1949; 34:1538-43
- 100) Jädersten, M., Montgomery, S., Dybedal, I., Porwit-MacDonald, A., & Hellstrom-Lindberg, E. (2005). Long-term outcome of treatment of anemia in MDS with erythropoietin and G-CSF. *Blood*, 106, 803–111.
- 101) Jonásova A, Neuwirtová R, Cermák J, et al. Cyclosporin A therapy in hypoplastic MDS patients and certain refractory anaemias without hypoplastic bone marrow. *Br J Haematol*. 1998;100:304-9.
- 102) Johnston L. Acute graft-versus-host disease: differing risk with differing graft sources and conditioning intensity. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2008 Vol. 21, No. 2: 177–192.
- 103) Jourdan E, Boiron JM, Dastague N et al. Early allogeneic stem-cell transplantation for young adults with acute myeloblastic leukemia in first complete remission: an intent-to-treat long-term analysis of the BGMT experience. *J Clin Oncol* 2005;23:7676–84.
- 104) Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, et al Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer*. 2006 Apr 15;106(8):1794-803.
- 105) Kantarjian HM, O'Brien S, Huang X, et al. Survival advantage with decitabine versus intensive chemotherapy in patients with higher risk myelodysplastic syndrome: comparison with historical experience. *Cancer*. 2007 Mar 15;109(6):1133-7.
- 106) Kern W, Estey E.H. High-dose cytosine arabinoside in the treatment of acute myeloid leukaemia. *Cancer* 2006; 107: 116-124.
- 107) KhorilF, KeatingM, KorblingMetal. 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.
- 108) Killick SB, Mufti G, Cavenagh JD, Mijovic A, et al A pilot study of antithymocyte globulin (ATG) in the treatment of patients with 'low-risk' myelodysplasia. *Br J Haematol*. 2003;120(4):679-84.

- 109) Kita-Sasai Y, Horiike S, Misawa S et al. International prognostic scoring system and TP53 mutations are independent prognostic indicators for patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2001; 115:309-312.
- 110) Kolb, H J, Mittermüller, J., Clemm, C., Holler, E., Ledderose, G., Brehm, G., Heim, M., et al. (1990). Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients *Blood*, 76(12), 2462–2465.
- 111) Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, et al. Graft-versus-Leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 1995; 86:2041-50.
- 112) Kolb, Hans-Jochem, Schmid, C., Barrett, A. J., & Schendel, D. J. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras *Blood*, 2004;103(3), 767–776.
- 113) Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, Honda S, Sierra J, Djulbegovic BJ, et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA*. 2009; 301(22):2349–61.
- 114) Kornblith AB, Herndon JE 2nd, Silverman LR, et al. Impact of azacytidine on the quality of life of patients with myelodysplastic syndrome treated in a randomized phase III trial: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 2002 May 15;20(10):2441-52.
- 115) Kottaridis PD, Milligan DW, Chopra R, et al. In vivo CAMPATH-1H prevents graft-versus-host disease following nonmyeloablative stem cell transplantation. *Blood* 2000;96:2419–2425.
- 116) Kröger, N., Bacher, U., Bader, P., Böttcher, S., Borowitz, M. J., Dreger, P., Khouri, I., et al. NCI First International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Report from the Committee on Disease-Specific Methods and Strategies for Monitoring Relapse following Allogeneic Stem Cell Transplantation. Part I: Methods, Acute Leukemias, and Myelodysplastic Syndromes. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2010; 16(9), 1187–1211.
- 117) Lange, T., Hubmann, M., Burkhardt, R., Franke, G.-N., Cross, M., Scholz, M., Leiblein, S., et al. Monitoring of WT1 expression in PB and CD34+;

- donor chimerism of BM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Leukemia*, 2011; 25(3), 498–505.
- 118) Lazarus HM, Rowe JM: Reduced-intensity conditioning for acute myeloid leukemia: Is this strategy correct. *Leukemia* 2006; 20:1673-1682.
- 119) Leone G, Teofili L, Voso MT, Lübbert M. DNA methylation and demethylating drugs in myelodysplastic syndromes and secondary leukemias. *Haematologica*. 2002;87:1324-41
- 120) Levine JE, Braun T, Penza SL, et al: Prospective trial of chemotherapy and donor leukocyte infusions for relapse of advanced myeloid malignancies after allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2002; 20:405-412.
- 121) Ley, T. J., Ding, L., Walter, M. J., et al. (2010). DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 363(25), 2424–2433.
- 122) Li H, Kaufman CL, Boggs SS, Johnson PC, Patrene KD, Ildstat ST. Mixed allogeneic chimerism by sublethal approach prevents autoimmune diabetes and reverses insulinitis in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Immunol* 1996; 156: 380-388.
- 123) Li Z, Herold T, He C, Valk PJM, et al. Identification of a 24-Gene Prognostic Signature That Improves the European LeukemiaNet Risk Classification of Acute Myeloid Leukemia: An International Collaborative Study. *J. Clin. Oncol.* Publish ahead of sprint 2013 Feb 4.
- 124) List A, Kurtin S, Roe DJ, et al. Efficacy of Lenalidomide in Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med*. 2006;355:1456-1465.
- 125) List A, Dewald G, Bennett J, et al. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med*. 2006;355:1456-1465.
- 126) List AF. Lenalidomide--the phoenix rises.. *N Engl J Med*. 2007;357(21): 2183-6.
- 127) 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 Aug;12(1):197-201
- 128) Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative

- conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transpl*, 2008; 14: 641-650
- 129) Löwenberg B, Putten W, Theobald M et al. Effect of Priming with Granulocyte Colony-Stimulating Factor on the Outcome of Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* 2003, 349:743-752.
- 130) Lowenberg B, Ossenkoppele G.J, van Putten W et al. High-dose daunorubicine in older patients with acute myeloid leukaemia. *New England Journal of Medicine* 2009, 361:1235-1248.
- 131) Lowsky R, Takahashi T, Liu YP et al. Protective conditioning for acute graft versus host disease. *New Eng J Med* 2005; 353: 1321-31
- 132) Malcovati L, Della Porta M.G, Pascutto C et al. Prognostic Factors and Life Expectancy in Myelodysplastic Syndromes Classified According to WHO Criteria: A Basis for Clinical Decision Making. *J Clin Oncol* 2005: 7594-7603.
- 133) Malcovati L, Germing U, Kuendgen A et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology* 2007; 25: 3503-3510.
- 134) Malcovati, L., Porta, Della, M. G., Strupp, et al. (2011). Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). *Haematologica*, 96(10), 1433–1440.
- 135) Marcucci G, Maharry K, Whitman S.P, et al. High Expression Levels of the ETS-Related Gene, ERG, Predict Adverse Outcome and Improve Molecular Risk-Based Classification of Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology* 2007; 25:3337-3343
- 136) Marks DI, Lush R, Cavenagh J, et al: The toxicity and efficacy of donor lymphocyte infusions given after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002; 100:3108-3114.
- 137) Marks P, Rifkind RA, Richon VM, et al. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer*. 2001;1:194-202.
- 138) Martino R, Caballero MD, Canals C et al for the alloPBSCT subcommittee of the Spanish Group for Hematopoietic Transplantation (GETH) and the Group GEL-TAMO. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with

- reduced-intensity conditioning: results of a prospective multi-center study. *Br J Haematol* 2001; 115: 653–659.
- 139) Martino, R., Caballero, M. D., Pérez-Simón, J. A., Simón, J. A. P., Canals, C., Solano, C., Urbano-Ispizua, A., et al. (2002). Evidence for a graft-versus-leukemia effect after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes *Blood*, 100(6), 2243–2245.
- 140) Martino R, Iacobelli S, Brand R, et al. Retrospective comparison of reduced-intensity conditioning and conventional high-dose conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using HLA-identical sibling donors in myelodysplastic syndromes *Blood*, 2006; 108: 836 - 846.
- 141) Maschek H, Gutzmer R, Choritz H and Georgii A. Life expectancy in primary myelodysplastic syndromes: A prognostic score based upon histopathology from bone marrow biopsies of 569 patients. *Eur J Haematol* 1994; 53: 280-287.
- 142) Mattsson J, Uzunel M, Brune M et al. Mixed chimerism is common at the time of acute graft-versus-host disease response in patients receiving non-myeloablative conditioning and allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2001; 115: 935–944.
- 143) Mattsson J, Uzunel M, Remberger M et al. T-cell mixed chimerism is significantly correlated to a decreased risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation* 2001; 71: 433–439.
(B)
- 144) Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA et al. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. *N Engl J Med*. 1994;331:896-903.
- 145) McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA et al. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood* 2001; 97: 3390–3400.
- 146) M Michallet, M Sobh, D Milligan, S Morisset et al. The impact of HLA matching on long-term transplant outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for CLL: a retrospective study from the EBMT registry. *Leukemia* 2010 ; 24, 1725-1731.

- 147) Mohty, M., de Lavallade, H., Ladaïque, P., Faucher, C., Vey, N., Coso, D., Stoppa, A.-M., et al. The role of reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia: a donor vs no donor comparison. *Leukemia* 2005; 19(6), 916–920.
- 148) Molina A, McSweeney P, Maloney DG et al. Degree of early donor T-cell chimerism predicts GVHD and graft rejection in patients with nonmyeloablative hematopoietic stem cell allografts. *Blood* 1999; 94: 394a.
- 149) Molldrem JJ, Caples M, Mavroudis D, et al. Antithymocyte globulin for patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 1997; 99:699-705.
- 150) Moore J.O, George S.L, Dodge R.K, et al. Sequential multiagent chemotherapy is not superior to high-dose cytarabine alone as postremission intensification therapy for acute myeloid leukemia in adults under 60 years of age: Cancer and Leukemia Group B Study 9222 *Blood* 2005; 105: 3420 - 3427.
- 151) Maurice Morrison, A. A. Samwick. Intramedullary (sternal) transfusion of human bone marrow: preliminary report *J Am Med Assoc.* 1940;115(20): 1708-1711.
- 152) Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev.* 2004 Jun;18(2):115-36.
- 153) Nagler A, Ackerstein A, Kapelushnik J, Or R, Naparstek E, Slavin S. Donor lymphocyte infusion post- non-myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for chronic granulomatous disease. *Bone Marrow Transplant* 1999;24:339–342.
- 154) Nagler A, Aker M, Or R et añ. Low-intensity conditioning is sufficient to ensure engraftment in matched unrelated bone marrow transplantation. *Wxp He,atol* 2001, 29; 360-72.
- 155) NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [™] . Myelodysplastic syndromes v.1.2009. Available at: www.nccn.org. Accessed on October 21, 2008.
- 156) Negrin RS; Stein R; Doherty K; Cornwell J; et al. Maintenance treatment of the anemia of myelodysplastic syndromes with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin: evidence for in vivo synergy. *Blood* 1996;87:4076-81.

- 157) Newell DJ. Intention-to-treat analysis: implications for quantitative and qualitative research. *Int J Epidemiol* 1992; 21: 837–841.
- 158) Ortega J, List A. Immunomodulatory drugs in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Curr Opin Oncol*. 2007;19(6):656-9. Review.
- 159) Osgood EE, Riddle MC, Mathews TJ. Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow. *Ann Intern Med* 1939; 13:357-67
- 160) Padua RA, Guinn B.A, Al-Sabah A et al. RAS, FMS and p53 mutations and poor clinical outcome in myelodysplasias: a 10-year follow-up. *Leukemia* 1998; 12:887-92.
- 161) Park, S., Grabar, S., & Kelaidi, C. (2008). Predictive factors of response and survival in myelodysplastic syndrome treated with erythropoietin and G-CSF: the GFM experience. *Blood* , 111, 574–582.
- 162) Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Storm H (eds.). *Cancer incidence in five continents*. Lyon: International Agency for Research on Cancer. Vol. I-VIII. IARC (IARC Cancer Base No. 7, Lyon, 2005).
- 163) Pérez-Simón JA, Kottaridis PA, Rodrigo Martino R et al. Nonmyeloablative transplantation with or without alemtuzumab: comparison between 2 prospective studies in patients with lymphoproliferative disorders. *Blood* 2002; 100: 3121-312.
- 164) Perez-Simon JA, Díez-Campelo M, Martino R, et al. Impact of CD34+ cell dose on the outcome of patients undergoing reduced intensity conditioning allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 2003; 102:1108–1113.
- 165) Perez-Simon JA, Díez-Campelo M, Martino R, Brunet S, Urbano A, Caballero MD, León A, Valcarcel D, Carreras E, Cañizo MC, Lopez-Fidalgo J, Sierra J, and San Miguel JF. Influence of the intensity of the conditioning regimen on the characteristics of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic transplantation. *British Journal of Haematology*, 2005; 130, 394–403
- 166) Phillips G.L, Reece D.E, Shepherd J.D et al. High-dose cytarabine and daunorubicin induction and postremission chemotherapy for the treatment of acute myelogenous leukemia in adults. *Blood* 1991;77:1429-1435

- 167) Pileri S.A, Orazi.A, Falini B. Myeloid sarcoma. In Swerdlow S.H, Campo E, Harris N.L et al (Eds). World Health Organization Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon 2008.
- 168) Platzbecker U, Thiede C, Fussel M, et al: Reduced intensity conditioning allows for up-front allogeneic hematopoietic stem cell transplantation after cytoreductive induction therapy in newly- diagnosed high-risk acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006; 20:707-714
- 169) Porter D, Levine JE: Graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia after donor leukocyte infusion. *Semin Hematol* 2006, 43:53-61.
- 170) Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, Thomas ED. Consensus Conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:825–830.
- 171) Pruneri G, Bertolini F, Soligo D, Carboni N, Cortelezzi A, Ferrucci PF, Buffa R, Lambertenghi-Deliliers G, Pezzella F. Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *Br J Cancer*. 1999 Dec;81(8):1398-401.
- 172) Radmacher M.D, Marcucci G, Ruppert A.S, et al.
- 173) Independent confirmation of a prognostic gene-expression signature in adult acute myeloid leukemia with a normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study *Blood*, 2006; 108: 1677 - 1683.
- 174) Ravandi F, Burnett AK, Agura ED, Kantarjian HM. Progress in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2007;110:1900-1910
- 175) Raza A, Meyer P, Dutt D, et al. Thalidomide produces transfusion independence in long-standing refractory anemias of patients with myelodysplastic syndromes *Blood*, 2001; 98: 958 - 965.
- 176) Raza A, Reeves JA, Feldman EJ, et al Phase 2 study of lenalidomide in transfusion-dependent, low-risk, and intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes with karyotypes other than deletion 5q. *Blood*. 2008;111:86-93.
- 177) Reuter CWM, Morgan M.A, and Bergmann L. Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood*, Sep 2000; 96: 1655 - 1669.
- 178) Sandmaier, B. M., Bethge, W. A., Wilbur, D. S., Hamlin, D. K., Santos, E. B., Brechbiel, M. W., Fisher, D. R., et al. (2002). Bismuth 213-labeled anti-CD45 radioimmunoconjugate to condition dogs for nonmyeloablative allogeneic marrow grafts *Blood*, 100(1), 318–326.

- 179) Sanz GF, Sanz MA, Vallespi T, et al. Two regression models and a scoring system for predicting survival and planning treatment in myelodysplastic syndromes: a multivariate analysis of prognostic factors in 370 patients. *Blood* 1989; 74: 395–408.
- 180) Sauntharajah Y, Nakamura R, Wesley R, et al simple method to predict response to immunosuppressive therapy in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2003;102: 3025-3027.
- 181) Sayer HG, Kroger M, Beyer J, et al: Reduced intensity conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia: Disease status by marrow blasts is the strongest prognostic factor. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31:1089-1095
- 182) Schanz J, Tuchler H, Sole F, et al. New Comprehensive Cytogenetic Scoring System for Primary Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Oligoblastic Acute Myeloid Leukemia After MDS Derived From an International Database Merge. *J. Clin. Oncol.* 2012 ;30(8):820–9.
- 183) Schiller G, Gajewski J, Nimer S et al. A randomized study of intermediate versus conventional-dose cytarabine as intensive induction for acute myelogenous leukaemia. *British Journal of Haematology* 1996; 81:170-177.
- 184) Schmid C, Schleuning M, Ledderose G, Tischer J, Kolb HJ: Sequential regimen of chemotherapy, reduced-intensity conditioning for allogeneic stem-cell transplantation, and prophylactic donor lymphocyte transfusion in high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol* 2005; 23:5675-5687.
- 185) Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, Frohling S et al. Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2008; 358:1909-1019.
- 186) Sharabi, Y., Abraham, V. S., Sykes, M., & Sachs, D. H. (1992). Mixed allogeneic chimeras prepared by a non-myeloablative regimen: requirement for chimerism to maintain tolerance *Bone Marrow Transplantation*, 9(3), 191–197.
- 187) Schnittger, S., Haferlach, C., Ulke, et al. IDH1 mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated NPM1 status. *Blood*, 116(25), 5486–5496.

- 188) Shigeki Ohtake, Shuichi Miyawaki, Hiroyuki Fujita, et al. Randomized study of induction therapy comparing standard-dose idarubicin with high-dose daunorubicin in adult patients with previously untreated acute myeloid leukemia: JALSG AML201 Study. *Blood First Edition Paper*, prepublished online August 6, 2010; DOI 10.1182/blood-2010-03-273243
- 189) Shimamoto T, Tohyama K, Okamoto T. Cyclosporin A therapy for patients with myelodysplastic syndrome: multicenter pilot studies in Japan. *Leuk Res.* 2003;27:783-8.
- 190) Shimoni A, Hardan I, Shem-Tov N, et al: Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in AML and MDS using myeloablative versus reduced-intensity conditioning: The role of dose intensity. *Leukemia* 2006; 20:322-328.
- 191) Sierra J, Pérez WS, Rozman C, et al Bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment for myelodysplasia *Blood*,2002; 100: 1997 - 2004.
- 192) Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol.* 2002;20:2429-40.
- 193) Silverman LR, McKenzie DR, Peterson BL, et al. Further analysis of trials with azacitidine in patients with myelodysplastic syndrome: studies 8421, 8921, and 9221 by the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol.* 2006; 24:3895-903.
- 194) Singal DP, Mickey MR, Terasaki PI. Serotyping for homotransplantation. XXIX. Two new HL-A antigens. *Transplantation.* 1969 Sep;8(3):235-40.
- 195) Slavin, S., Fuks, Z., Kaplan, H. S., & Strober, S. (1978). Transplantation of allogeneic bone marrow without graft-versus-host disease using total lymphoid irradiation *The Journal of experimental medicine*, 147(4), 963–972
- 196) Slavin, S., Naparstek, E., Nagler, A., Ackerstein, A., Samuel, S., Kapelushnik, J., Brautbar, C., et al. (1996). 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(6), 2195–2204
- 197) 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.
- 198) Slovack M.L, Kopecky K.J, Cassileth P.A. Karyotypic análisis predicts outcome of prerremisión and postremission therapy in adult cute myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96:4075-4083.
- 199) Sole F, Luno E, Sanzo C, et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2005; 90:1168–1178.
- 200) Soriano A.O, Yang H, Faderl S, et al Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood*,; 110: 2302 - 2308.
- 201) Sorrow ML, Maris MB, Storer B, Sandmaier BM, Diaconescu R, Flowers C, Maloney DG, Storb R. Comparing morbidity and mortality of HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative and myeloablative conditioning: influ- ence of pretransplant comorbidities. *Blood* 2004;104:961– 968.
- 202) Mohamed L. Sorrow, Michael B. Maris, Rainer Storb, Frederic Baron, Brenda M. Sandmaier, David G. Maloney, and Barry Storer. Hematopoietic cell transplantation (HCT)–specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood* 2005;106: 2912-2919
- 203) Mohamed L. Sorrow and Rainer F. Storb. Role of Comorbidities in Optimizing Decision-Making for Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2010 January 1; 2(2): 1-10
- 204) Spitzer TR, McAfee S, Sacktein, et al Intentional induction of mixed chimerism and achievement of antitumor responses after nonmyeloablative conditioning therapy and HLA-matched bone marrow transplant for refractory hematologic malignancies. *Biol Blood and Marrow Transplant* 2000; 6: 309-320.
- 205) Spyronidis A, Bertz H Ihorst G et al.Hematopoietic cell transplatation from unrelated donors as an effective therapy for older patientes (>60 years) with active myelodi malignancies. *Blood*, 2005; 105:4147-4148.
- 206) Stone RM. How I treat patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2009; 113: 6296 - 6303.

- 207) 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 Mar;9(3):240-6. Storb, R., Raff, R. F., Appelbaum, F. R., Graham, T. C., Schuening, F. G., Sale, G., & Pepe, M. Comparison of fractionated to single-dose total body irradiation in conditioning canine littermates for DLA-identical marrow grafts *Blood*, 1989; 74(3), 1139–1143.
- 208) Storb, R., Yu, C., Wagner, J. L., Deeg, H. J., Nash, R. A., Kiem, H. P., Leisenring, W., et al. Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation *Blood*, 1997; 89(8), 3048–3054.
- 209) Storb, R., Yu, C., Zaucha, J. M., Deeg, H. J., Georges, G., Kiem, H. P., Nash, R. A., et al. (1999). Stable mixed hematopoietic chimerism in dogs given donor antigen, CTLA4Ig, and 100 cGy total body irradiation before and pharmacologic immunosuppression after marrow transplant *Blood*, 94(7), 2523–2529.
- 210) Suciú S, Mandelli F, De Witte T et al. Allogeneic compared to autologous stem cell transplantation in the treatment of patients <46 years old with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1): an intention to treat analysis of the EORTC/GIMEMA AML-10 trial. *Blood* 2003;102: 1232–40.
- 211) Sykes, M., Szot, G. L., Swenson, K. A., & Pearson, D. A. Induction of high levels of allogeneic hematopoietic reconstitution and donor-specific tolerance without myelosuppressive conditioning *Nature medicine*, 1997, 3(7), 783–787
- 212) Sykes M, Preffer F, McAfee S, et al. Mixed lymphohaemopoietic chimerism and graft-versus-lymphoma effects after non-myeloablative therapy and HLA-mismatched bone-marrow transplantation. 1999; 353: 1755-1759
- 213) Tamaki H, Ogawa H, Ohyashiki K, et al. The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1999;13: 393-399.
- 214) Tricot G; Boogaerts MA The role of aggressive chemotherapy in the treatment of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1986 Jul;63(3): 477-83.

- 215) Thomas ED, Lochte H, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy., *N Engl J Med* 1957, 257(11), 491–496
- 216) Thomas ED, Lochte H L, Cannon J H , Sahler O D , and Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Investi* 1959; 38: 1709-16
- 217) Urbano-Ispizua A, Brunet S, Solano C, Moraleda JM, Rovira M, Zuazu J et al. Allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood in patients with myeloid malignancies in early phase: a case control comparison with unmodified peripheral blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 349–354.
- 218) Valcarcel D, Martino R, Caballero D, et al. Chimerism analysis following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:387–392.
- 219) Valcárcel D and Martino R. Reduced intensity conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in myelodysplastic syndromes and acute myelogenous leukemia. *Curr Opin Oncol* 2007;19 (6): 660-666
- 220) Vardiman J.W, Arber D. A, Brunning R.D, et al. Therapy-related myeloid neoplasias. In Swerdlow S.H, Campo E, Harris N.L et al (Eds). *World Health Organization Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press: Lyon 2008.
- 221) Wallvik J, Stenke L, Bernell P et al. Serum erythropoietin (EPO) levels correlate with survival and independently predict response to EPO treatment in patients with myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol* 2002; 68: 180-6.
- 222) Wattel E; Solary E; Hecquet B; et al. Quinine improves the results of intensive chemotherapy in myelodysplastic syndromes expressing P glycoprotein: results of a randomized study. *Br J Haematol* 1998 Sep;102(4): 1015-24.
- 223) Weick J.K, Kopecky K.J, Appelbaum F.R et al. A randomized investigation of high-dose versus standard-dose cytosine arabinoside with daunorubicine in patients with previously untreated acute myeloid leukemia. A southwest Oncology Group Study. *Blood* 1996; 88: 2841-2851.
- 224) Weiden, P. L., Flournoy, N., Thomas, E. D., Prentice, R., Fefer, A., Buckner, C. D., & Storb, R. (1979). Antileukemic effect of graft-versus-host disease in

- human recipients of allogeneic-marrow grafts *New England Journal of Medicine*, 300(19), 1068–1073.
- 225) Weiden, P. L., Sullivan, K. M., Flournoy, N., Storb, R., & Thomas, E. D. (1981). Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation *New England Journal of Medicine*, 304(25), 1529–1533.
- 226) Weisser M, Kern W, Rauhut S, et al. Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2005;19:1416-1423.
- 227) Wekerle, T., Sayegh, M. H., Hill, J., Zhao, Y., Chandraker, A., Swenson, K. G., Zhao, G., et al. (1998). Extrathymic T cell deletion and allogeneic stem cell engraftment induced with costimulatory blockade is followed by central T cell tolerance *The Journal of experimental medicine*, 187(12), 2037–2044
- 228) de Witte T; Suciú S; Verhoef G; et al. Intensive chemotherapy followed by allogeneic or autologous stem cell transplantation for patients with myelodysplastic syndromes (MDSs) and acute myeloid leukemia following MDS. *Blood* 2001 Oct 15;98(8):2326-31.
- 229) Yanada M, Matsuo K, Emi N, et al. Efficacy of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on cytogenetic risk for acute myeloid leukemia in first disease remission. *Cancer*. 2005;103:1652-1658.
- 230) Yakoub-Agha I, de La Salmonière P, Ribaud P, et al Allogeneic Bone Marrow Transplantation for Therapy-Related Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia: A Long-Term Study of 70 Patients—Report of the French Society of Bone Marrow Transplantation *J.Clin Oncol* 2000: 963.
- 231) Yu, C., Storb, R., Mathey, B., Deeg, H. J., Schuening, F. G., Graham, T. C., Seidel, K., et al. DLA-identical bone marrow grafts after low-dose total body irradiation: effects of high-dose corticosteroids and cyclosporine on engraftment *Blood*, 1995;86 (11), 4376–4381.
- 232) Yu, C., Seidel, K., Nash, R. A., Deeg, H. J., Sandmaier, B. M., Barsoukov, A., Santos, E., et al. Synergism between mycophenolate mofetil and cyclosporine in preventing graft-versus-host disease among lethally irradiated dogs given DLA-nonidentical unrelated marrow grafts *Blood*, 1998; 91(7), 2581–2587

- 233) Zeiser R, Spyridonidis A, Wasch R, Ihorst G, Grulich C, Bertz H et al. Evaluation of immunomodulatory treatment based on conventional and lineage-specific chimerism analysis in patients with myeloid malignancies after myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Leukemia* 2005; 19: 814–821.