



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA

TESIS DOCTORAL

COMPLICACIONES DEL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE
PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS: ENFERMEDAD
DE INJERTO CONTRA EL RECEPTOR Y PREDISPOSICIÓN
A INFECCIONES. ESTRATEGIAS DE MEJORA.

IRENE GARCÍA CADENAS

2017

Directores: Dr. Rodrigo Martino Bofarull

Prof. Jordi Sierra Gil

A mi yaya, que alumbró gran parte de este camino.

Agradecimientos

Quiero recordar y reconocer...

A **mis padres**, porque no existe mejor modelo de esfuerzo y superación, pero sobre todo, por su apoyo incondicional y su amor infinito.

A **Arnau**, por aparecer y quedarse.

Al **Hospital de Sant Pau**, donde me formé como médico y hematóloga, un centro de excelencia dónde me siento en casa y trabajo rodeada de amigos.

Al Dr. **Rodrigo Martino** y al Prof. **Jordi Sierra**, los dos directores de esta tesis. Al primero, por su ayuda, su capacidad de sacar tiempo de dónde no lo hay para comentar proyectos y pacientes y por la enorme oportunidad que supone seguir creciendo como médico y persona a su lado. Al segundo, por ofrecerme su dirección, sus consejos y su confianza de forma tan prematura y sin prácticamente conocerme, y por facilitarme todas las herramientas necesarias para llevar a cabo tanto este proyecto como mi estancia formativa en tierras alemanas.

Y por último, y de manera muy especial, a **David Valcárcel**, por transmitirme todo su entusiasmo cuando era estudiante, por su paciencia durante mis primeros años de residencia y por seguir escuchando cada vez que aparece una decisión importante. Sin él, esta tesis doctoral probablemente no existiría.

Tabla de contenidos

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	9
1. Antecedentes y motivación de la tesis	11-12
2. Ámbito de estudio y justificación de la unidad temática	13
3. Introducción general	
1. El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos	15-21
a. Reseña histórica	
b. El alo-TPH en la actualidad	
c. Conceptos básicos del alo-TPH	
2. Complicaciones frecuentes del trasplante alogénico	22-32
a. Enfermedad de injerto contra el receptor aguda	
b. Infecciones oportunistas	
4. Impacto de las complicaciones post-trasplante alogénico	
1. Prevención de la EICR	33-46
a. Conceptos básicos	
b. Antecedentes y estrategias actuales	
c. Nuevas dianas	
d. Papel de la CsA en el éxito del TPH. Optimización de su manejo.	
e. Justificación del Manuscrito número 1	
2. Tratamiento de la EICR aguda	47-57
a. Conceptos básicos	
b. Tratamiento sistémico de primera línea en la actualidad	
c. Refratariedad a esteroides	
d. Tratamiento de rescate en la actualidad	
e. Mejoras en el diseño de nuevos estudios sobre EICR	
f. Justificación del Manuscrito número 2	
3. Complicaciones infecciosas y EICR aguda	58-67
a. Conceptos básicos	
b. Factores predisponentes en la aparición de infecciones	
c. Infecciones en pacientes con EICRa	
d. Infecciones en pacientes con EICRa refractaria a esteroides	
e. Mejoras en el manejo de las infecciones post-TPH y justificación del Manuscrito número 3	
5. Hipótesis y objetivos específicos de los estudios	69-70

6. Resultados	72-103
1. Artículo 1: García-Cadenas I, Valcárcel D, Martino R, et al. Impact of Cyclosporine levels on the development of acute Graft Versus Host Disease after HLA identical sibling reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. Mediators of Inflammation. 2014; 2014: 620682: 1-7.	
a. Diseño del estudio	74-84
b. Resultados	
c. Publicación en su versión original	
2. Artículo 2: García-Cadenas I, Valcárcel D, Martino R, et al. Updated Experience with Inolimomab as treatment for Corticosteroid-Refractory Acute Graft versus Host Disease. Biol Blood Marrow Transplant. 2013 Mar; 19 (3):435-9.	
a. Diseño del estudio	85-92
b. Resultados	
c. Publicación en su versión original	
3. Artículo 3: García-Cadenas I, Rivera I, Martino R, et al. Patterns of infection and infectious-related mortality in patients with steroid-refractory acute Graft versus Host Disease. Bone Marrow Transplant. 2017 Jan;52(1):107-113.	
a. Diseño del estudio	93-103
b. Resultados	
c. Publicación en su versión original	
7. Discusión	105-119
1. Sobre el primer trabajo de la Tesis	106-109
2. Sobre el segundo trabajo de la Tesis	110-112
3. Sobre el tercer trabajo de la Tesis	113-117
4. Próximos pasos	118-119
8. Conclusiones	120
9. Referencias bibliográficas	122-143

Glosario de abreviaturas

AloTIR: trasplante alogénico con intensidad reducida

Alo-TPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

CIBMTR: Center for International Blood and Marrow Transplant Research

CMV: citomegalovirus

CsA: ciclosporina

DE: donante emparentado

DNE: donante no emparentado

EBMT: *European Group for Blood and Marrow Transplantation*

EICR: enfermedad de injerto contra el receptor

EICT: enfermedad de injerto contra el tumor

GM: galactomanano

HLA: human leukocyte antigen

IFI: infección fúngica invasiva

IRBV: infección respiratoria de vías bajas

MFM: micofenolato mofetilo

MRI: mortalidad relacionada con la infección

MRT: mortalidad relacionada con el trasplante

PH: progenitores hematopoyéticos

RC: respuesta completa

RP: respuesta parcial

SG: supervivencia global

VEB: virus de Epstein-Barr

1. Antecedentes y Motivación de la tesis

Imagino este primer apartado plagado de anécdotas y curiosidades que ilustran las múltiples coincidencias que me llevaron a la elección de la temática de este trabajo. Sin embargo, si hecho la vista atrás aparece un camino bien definido en el que, muy de tanto en tanto, tuve que decidir hacia donde avanzar. Afortunadamente, en esos momentos de incerteza estuve siempre rodeada de “personas clave” que me aconsejaron y facilitaron el trabajo.

Primero mis padres, y su “claro que sí, medicina es una buena opción y vas a lograrlo, aunque la biofísica te suene a chino”. Después mis amigos: ¿qué hospital? pues...Sant Pau, que es grande, pero “con caliu” y podrás tomar el sol en los jardines! Y probablemente esa segunda elección condicionó todas las siguientes.

Asociar Sant Pau a una de las mejores etapas de mi vida y conocer durante el rotatorio como estudiante a grandes profesionales con enorme vocación y habilidad en el trato de los pacientes, disipó las escasas dudas iniciales sobre la especialidad y centro a elegir.

Ya desde el comienzo de “la residencia” el trasplante de progenitores hematopoyéticos y sus complicaciones generaron en mí un especial interés. Sin embargo, no puedo dejar de mencionar que gran parte de la motivación y las ideas para el desarrollo de los trabajos que conforman esta tesis (y algunos otros), que se gestaron durante ese periodo, se las debo a David Valcárcel, que se ha encargado desde que nos conocimos de recordarme la importancia de combinar práctica asistencial e investigación.

Justo al finalizar mi formación MIR, tuve además la suerte de contar con el apoyo del Dr. Sierra y el Dr. Martino, que confiaron en mí y me ayudaron a acabar de definir la línea de investigación en que seguir trabajando. Gracias a ellos y con el sustento de varias “becas y bolsas de viaje” el proyecto continuó con un periodo formativo de un año y medio en el Laboratorio de Oncología Translacional del Hospital Universitario de Würzburg, centro dirigido por el Prof. Hermann Einsele.

Bajo la supervisión directa del Dr. Michael Hudecek, tuve la oportunidad de formarme como investigadora en un campo de candente interés, la introducción de innovadoras estrategias de terapia celular adoptiva anti-tumoral y anti-infecciosa en el ámbito de la Hematología. Esa estancia, no solamente supuso un salto enorme al vacío a nivel personal sino que cambió radicalmente mi manera de entender esta profesión y me dotó de nuevas herramientas con las que trabajar en el futuro.

Confío en que la defensa de esta tesis doctoral llegue en el momento apropiado. Contiene toda la ilusión de mis primeros años en el mundo de la Hematología y de mi etapa de aprendizaje fundamental, centra el interés en varios de los aspectos que considero claves en la mejora futura de los resultados del alo-TPH y espero abra una nueva etapa en mi camino donde la generación de conocimiento y el crecimiento personal sigan de la mano.

2. Ámbito de estudio y justificación de la unidad temática

La presente tesis doctoral recoge los resultados de tres estudios publicados en revistas internacionales especializadas en TPH que siguen un hilo argumental común entorno a las dos principales causas de morbi-mortalidad tras este procedimiento, la EICR aguda y las infecciones oportunistas. Cada uno de ellos incide en un aspecto concreto y de relevancia dentro de este contexto.

En el primer trabajo, se analiza el impacto de un manejo adecuado de la **profilaxis** farmacológica en la aparición de EICR aguda y los resultados del trasplante a largo plazo. El estudio se enmarca en una población muy homogénea de pacientes, lo que facilita la extracción de conclusiones. Se publicó en el 2014 en la revista *Mediators of Inflammation*.

El segundo, se centra en la importancia del apropiado diseño y el seguimiento prolongado en los estudios, al analizar la eficacia del **tratamiento** de rescate en pacientes con EICR aguda refractaria. Ello dió como resultado un artículo publicado en la revista *BBMT* en 2013.

Por último, el tercer trabajo describe en detalle la incidencia, momento de aparición y patógenos responsables de **infección grave y mortalidad infecciosa** en ese mismo escenario, la EICR aguda refractaria. Ha sido recientemente publicado (2016) en la revista *BMT*.

Cada uno de los estudios aporta información detallada y original sobre la complicación aloinmune post-TPH más frecuente, la EICR, así como de la inmunodepresión asociada que favorece las infecciones oportunistas. El enfoque de esta tesis permite una visión actualizada de la situación y de las posibles estrategias de mejora.

La temática elegida tiene un especial interés ya que, a diferencia de otros problemas clásicos asociados al trasplante como su toxicidad o el manejo de las recaídas de la enfermedad de base donde ha habido avances con repercusión positiva en los resultados finales, la EICR aguda permanece como el principal obstáculo, sin mejoras espectaculares desde su descripción hace décadas.

En este mismo escenario, y especialmente en caso de refractariedad a esteroides, las innovaciones en la profilaxis y monitorización de infecciones, que sí han resultado fundamentales en la mejora de la supervivencia post-TPH a lo largo de su historia, se muestran insuficientes. Se abre, por tanto, un nuevo ámbito de estudio centrado en el mayor conocimiento de los mecanismos de reconstitución inmune y la irrupción de la terapia celular adoptiva.

3. Introducción general

3.1 El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

3.1. a. Reseña histórica

No exageraríamos al catalogar como “singulares” los precedentes históricos del trasplante de progenitores hematopoyéticos. Fueron las repercusiones clínicas evidenciadas en personas expuestas a radiación ionizante en Hiroshima y Nagasaki durante la Segunda Guerra Mundial las que despertaron el interés inicial en la comunidad científica (Morrison et al, 1940; Jacobson et al, 1949; Barnes et al, 1957) con el desarrollo de modelos murinos centrados en el estudio de mecanismos protectores frente a la irradiación a dosis letales. En los años siguientes se mantuvo una intensa actividad investigadora en este campo, liderada por el grupo del Profesor Donnal Thomas, con experimentos piloto en modelos caninos, que supusieron el antecedente inmediato del trasplante de médula en humanos. En 1957 se publicaron los primeros resultados mostrando injertos hematopoyéticos temporales en algunos de los pacientes (Thomas et al, 1957).

Estas experiencias pioneras fueron previas al descubrimiento de los principios de histocompatibilidad. El reconocimiento de la importancia de la compatibilidad genética entre donante y receptor (definida por el sistema de compatibilidad leucocitaria antigénica humana, el “HLA”) a finales de los 50, no sólo valió el premio Nobel de Fisiología y Medicina a B. Benacerraf, J. Dausset y G. Snell sino que supuso un hallazgo vital en la historia del trasplante.

Muchos factores explican el escaso éxito inicial de la mayor parte de experiencias de trasplante. La modesta eficacia de la irradiación corporal total como tratamiento antitumoral único, la selección de pacientes en muy malas condiciones clínicas y con enfermedades en fase muy avanzada, la ausencia de soporte transfusional adecuado y la inexistencia de antimicrobianos efectivos, son sólo algunos de las más evidentes.

Fue a partir de la década de los 80 cuando se introdujeron, de forma mucho más rápida, el sumatorio de avances que han contribuido a configurar el perfil del alo-TPH en la actualidad. Entre los más destacables, el desarrollo de separadores celulares capaces de recolectar grandes cantidades de células de sangre periférica (McCreedie et al, 1971), el conocimiento biológico del efecto injerto contra el tumor (den Haan et al, 1995) y la EICR, entonces conocida como enfermedad secundaria (Barnes et al, 1957; Shlomchick et al, 1999).

Desde entonces y de forma sucesiva han aparecido nuevas formas de trasplante, con acondicionamientos no mieloablativos, fuentes de progenitores alternativas, inmunodepresores más eficaces y estrategias de manipulación de los componentes celulares que permiten superar, con procedimientos técnicos, las barreras del HLA.

A su vez, es preciso contextualizar la evolución actual y futura del trasplante en un marco de “globalización” donde ha resultado clave la participación y colaboración de múltiples sociedades científicas, con la creación de grupos cooperativos nacionales e internacionales como el *Grupo Español de Trasplante Hematopoyético (GETH)* o el *European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT)* y la aparición de registros de donantes y bancos de cordón umbilical universales.

Todos estos progresos han permitido que el alo-TPH sea la principal terapia curativa para un amplio grupo de pacientes con enfermedades hematológicas previamente letales. Tanto las indicaciones de trasplante como el grupo de potenciales candidatos al mismo se han expandido rápidamente durante las últimas décadas y es esperable que su rol evolucione todavía más gracias a los avances en el ámbito de la terapia celular adoptiva (Gooley et al, 2010; Doubrovina et al, 2012; Tsuboi et al, 2012).

3.1.b. El Alo-TPH en la actualidad

Los grandes avances logrados en las principales áreas del trasplante (optimización en la selección del donante, modulación de la intensidad del acondicionamiento e individualización de la profilaxis frente a la EICR y las infecciones oportunistas) y sus mejores resultados se reflejan de forma clara en los datos de registro, que muestran un continuo incremento en su actividad en las últimas dos décadas.



Figura. Actividad de trasplante de progenitores hematopoyéticos en España (1994-2014).

Fuente: Registro Organización Nacional de Trasplante (ONT).

En el año 2014 se reportaron en la encuesta anual del EBMT (Passweg et al, 2016) un total de 40.829 trasplantes en 36.469 pacientes, superando por primera vez la cifra de 40.000 procedimientos. De estos, 16.946 (42%) fueron alogénicos. En comparación con el 2013, el número total de alo-TPH aumentó un 4.5%. Además, se registraron un total de 4.360 segundos trasplantes, siendo un 27% de ellos alogénicos. Los datos comparativos reflejan un aumento del 22% en el número final de trasplantes en comparación al 2010 y un abrumador ascenso del 80% respecto a los reportados en el año 2000.

Los registros revelan a su vez otros datos interesantes, como la creciente actividad en el uso de donantes no emparentados (5% de aumento anual en el periodo 2011-2014) o el “boom” del trasplante haploidentico (incremento del 25% anual).

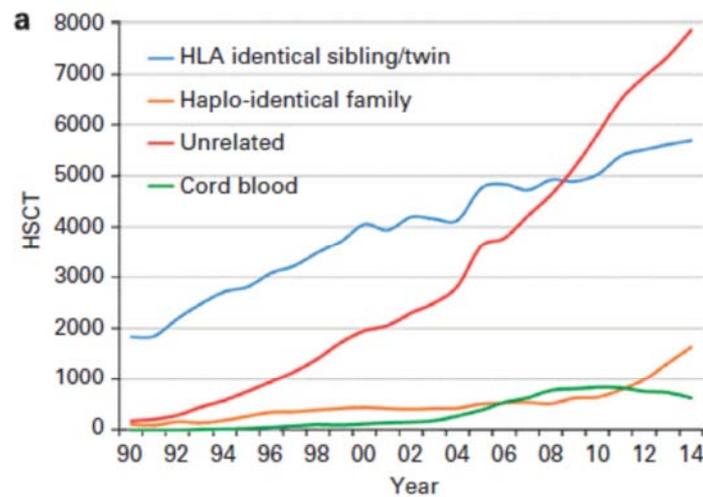


Figura. Número absoluto de los diferentes tipos de donante para alo-TPH en Europa (1990-2014)

Fuente: EBMT survey. Passweg et al, 2016

Es también destacable el marcado incremento en el uso de acondicionamiento de intensidad reducida, fundamentalmente en pacientes de edades media-avanzada o con comorbilidades importantes.

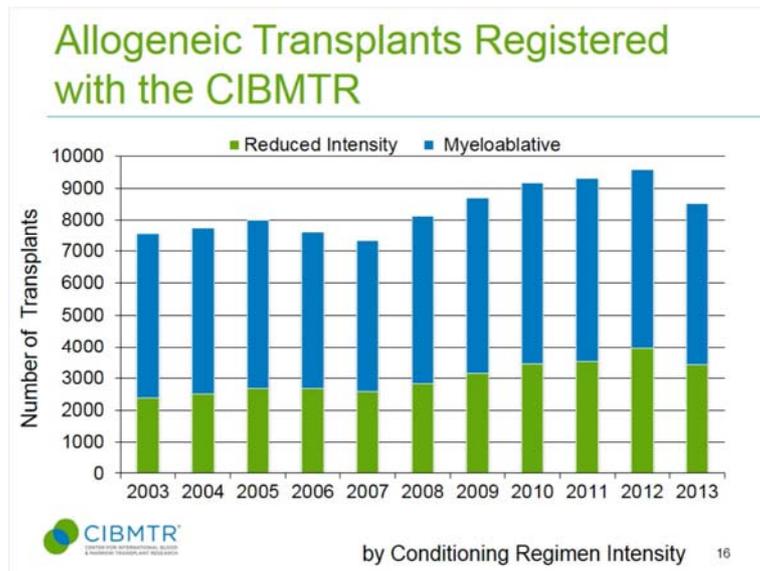


Figura. Evolución del número de Alo-TPH según la intensidad del acondicionamiento

Fuente: CIBMTR website. Summary Slides, 2015.

Tal y como se ha comentado previamente, estos datos serían inimaginables sin el trabajo constante de múltiples sociedades científicas y registros que han logrado que la disponibilidad rápida de un buen donante se convierta en una realidad.

Como ejemplo, el Plan Nacional de Médula Ósea, promovido por el Ministerio de Sanidad a través de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT), junto con los Servicios de Salud de las Comunidades Autónomas en el 2011, estableció como principal objetivo maximizar las probabilidades de realización de un alo-TPH con éxito, al aumentar la disponibilidad de un buen donante, en el momento óptimo, para el mayor número posible de pacientes.

El plan incluyó actuaciones para mejorar la información de la población y facilitar el proceso de registro a aquellas personas con deseo de ser donantes. Se multiplicó por seis la captación de donantes y se alcanzó el objetivo, 200.000 donantes registrados, un año antes de lo planificado. Por ello, en el 2015 se acordó su continuación con el propósito de duplicar de nuevo el número de donantes hasta llegar a 400.000 en el 2020.

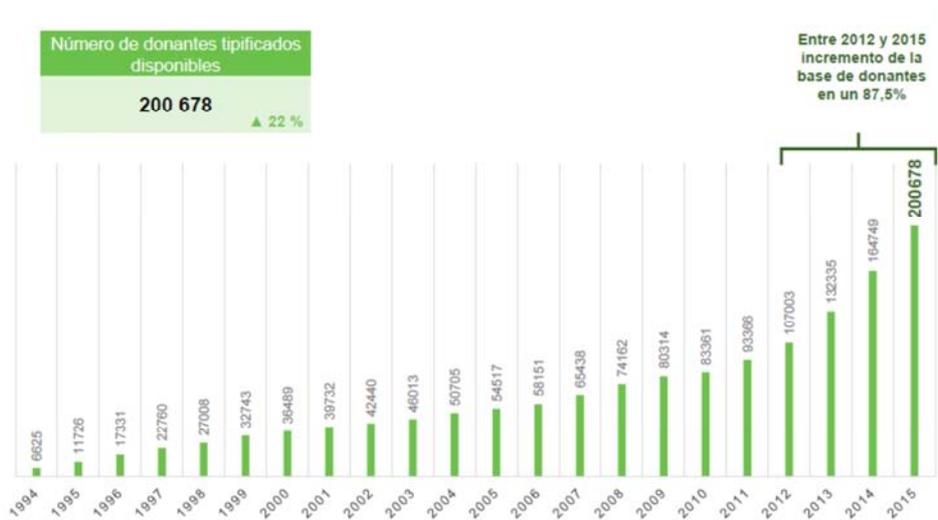


Figura. Evolución del número de donantes tipificados y disponibles en REDMO.

Fuente: Memoria anual REDMO, 2015.

Estrategias como el Plan Nacional de Médula han contribuido en gran medida a que, en el momento actual, un 90% de los pacientes dispongan de un buen donante identificado en los registros internacionales en un periodo medio de 33 días.

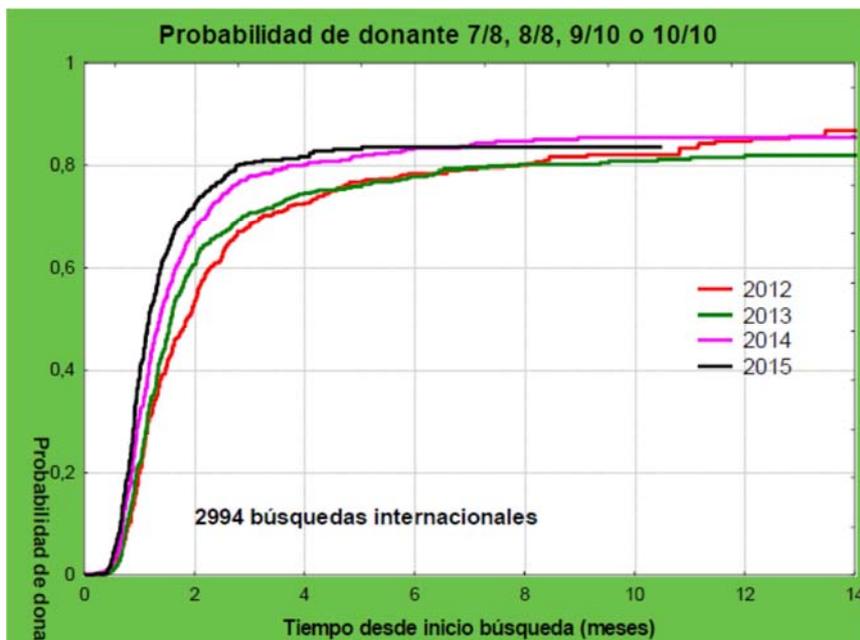


Figura. Probabilidad actuarial de encontrar un donante desde el momento de inicio de la búsqueda.

Fuente: Memoria anual REDMO, 2015.

3.1.c. Conceptos básicos del Alo-TPH

El alo-TPH es una estrategia potencialmente curativa frente a una amplia variedad de enfermedades, que se enmarca en el ámbito de la “terapia celular adoptiva”, y basa su eficacia especialmente en el caso de las patologías oncológica, en la reacción inmunológica de las células del donante frente a las células tumorales del paciente.

Para entender la capacidad curativa del procedimiento, es preciso conocer las características de los progenitores hematopoyéticos (PH), en especial su capacidad de autorrenovación, que permitirá al receptor la producción de células sanguíneas de forma mantenida a partir del donante. De igual o incluso mayor interés es el llamado “Efecto Injerto contra el Tumor” (EICT), que traduce la acción citotóxica de los linfocitos del donante contra las células neoplásicas del paciente.

El EICT se sustenta en diversos hallazgos, como la mayor incidencia de recidivas en receptores de trasplante singénico (en el que donante y receptor son genéticamente idénticos) respecto a la observada en trasplantes entre hermanos HLA idénticos no gemelos (Fefer et al, 1987) o la constatación de que la retirada precoz de inmunosupresores y/o la infusión diferida de linfocitos T del donante son capaces de lograr remisiones completas en pacientes con leucemia (Kolb et al, 1995). El EICT es un pilar fundamental en la capacidad curativa del alo-TPH y el principal fundamento para el desarrollo de los trasplantes no mieloablativos.

La indicación del TPH es un proceso individualizado en el que deben tenerse en cuenta tanto las características específicas de la enfermedad a tratar como la edad, comorbilidades y entorno social del paciente, entre otros aspectos. El análisis global de toda esta información determinará el tipo de trasplante más adecuado a realizar así como el momento idóneo en que programarlo.

A modo de resumen, los aspectos técnicos del alo-TPH siguen un modelo genérico:

1. Tratamiento de acondicionamiento: se basa en la administración de quimioterapia y/o radioterapia al paciente para erradicar o reducir el clon neoplásico y causante de recaída y disminuir la capacidad de su sistema inmune, facilitando así el injerto de los PH.
2. Infusión de PH: a las 24-72 horas de finalizar el régimen de acondicionamiento.
3. Prevención de la EICR y del fallo de injerto: de forma clásica, durante el periodo peritrasplante se inician fármacos inmunodepresores, solos o en combinación, que suelen mantenerse unos meses, hasta que se evidencia la llamada “tolerancia inmune”, que refleja la capacidad que adquieren los linfocitos T del donante para aceptar el resto de células del receptor sin desencadenar reacción inmunológica alguna (Storb et al, 1985; Perreault C et al, 1989).

Factores adicionales, como el desarrollo de EICR y la situación de la enfermedad de base, condicionarán también la duración de su administración.

De igual manera, es muy importante el adecuado control de las células T del receptor en la fase peri-TPH, en este caso para prevenir el fallo de implante, especialmente en el ámbito del TPH con acondicionamiento no mieloablativo. Este concepto fue establecido por McSweeney et al. quienes demostraron el acortamiento de la neutropenia, la reducción de los requerimientos transfusionales y las infecciones graves, lo que condiciona un menor periodo de hospitalización, tras la adición de fludarabina (30mg/m²) en receptores de alo-RIC acondicionado con dosis bajas de irradiación (2 Gy) en quienes se utilizó la combinación CsA-MFM como inmunodepresión post-injerto.

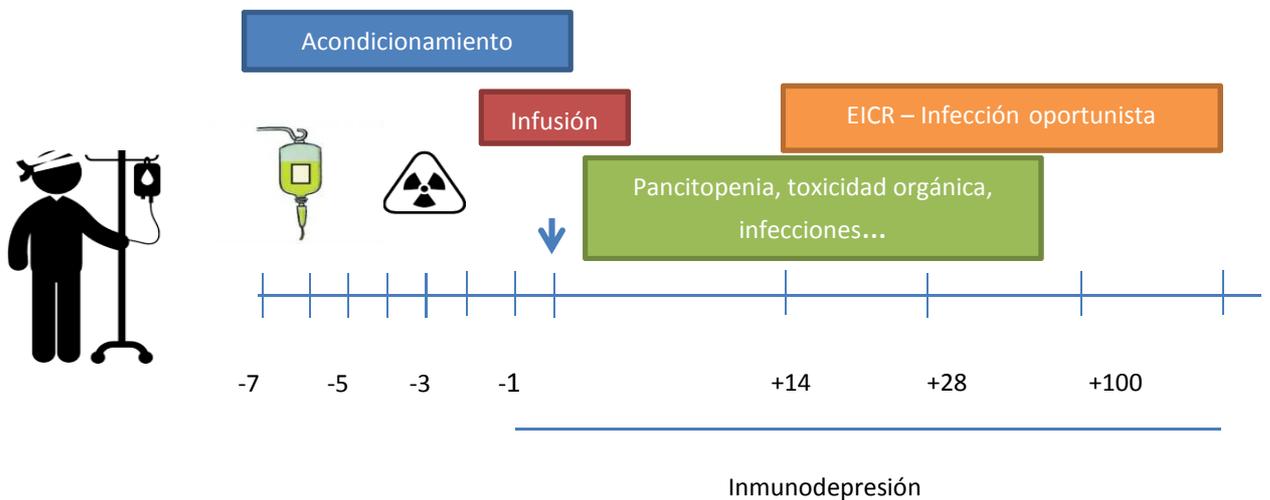


Figura. Esquema de las diferentes fases de un alo-TPH

3.2. Complicaciones más frecuentes del trasplante alogénico

La mayor parte de complicaciones post-TPH se relacionan con la lesión tisular producida por el tratamiento de acondicionamiento y los problemas inmunológicos derivados del aloinjerto. No es tarea del presente trabajo el profundizar en las características y momento de aparición de todas las complicaciones post-TPH, sino que centraremos la temática en los dos principales obstáculos responsables de la “mortalidad asociada al procedimiento”, la enfermedad de injerto contra el receptor aguda (EICRa) y las infecciones oportunistas, ambas claramente interrelacionadas y ámbito de estudio de la presente tesis doctoral.

3.2.a. Enfermedad injerto contra el receptor aguda

La EICRa es la complicación más característica del alo-TPH y consiste en un grupo de manifestaciones clínicas e histológicas consecuencia de la reacción inflamatoria secundaria al reconocimiento y posterior destrucción de antígenos extraños en el receptor a cargo de las células inmunocompetentes del donante.

A pesar del reconocimiento y estudio de su fisiopatología desde hace más de medio siglo (Barnes et al, 1957), la EICR sigue considerándose en la actualidad la principal causa de morbimortalidad en la fase precoz post-TPH (Vogelsang et al, 1994).

Tal y como describió Billingham en 1966 su aparición precisa de 3 requisitos:

1. El injerto debe contener células inmunocompetentes. Gowans las describió hace más de 40 años como “linfocitos pequeños”. Más tarde, McGregor demostró que derivaban de células madre de la médula ósea. En la actualidad sabemos que se trata de linfocitos T maduros del donante presentes en el injerto.
2. El receptor debe expresar antígenos tisulares no presentes en el donante. Las diferencias antigénicas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) entre el donante y el receptor constituyen el factor de riesgo clave para el desarrollo de la EICR. Nuevos estudios tratan de caracterizar la importancia de las discrepancias en otros antígenos del complejo menor de histocompatibilidad (Sun et al, 2007).
3. El receptor debe cursar con algún grado de inmunosupresión que le haga incapaz de generar una respuesta inmune y rechazar las células del donante.

Treinta años después de que Billingham describiera las bases de la EICR, Ferrara desarrolló el modelo clásico de su fisiopatología, que sigue vigente y suele dividirse en 3 fases:

1. Daño tisular y estimulación de las células presentadoras de antígeno (CPA)

El tratamiento de acondicionamiento, la enfermedad de base o el desarrollo de infecciones previas producen una lesión tisular que comporta que los antígenos proteicos liberados del receptor sean degradados a pequeños fragmentos por las CPA; estos péptidos antigénicos se unen a moléculas HLA clase I o II y son reconocidos por los linfocitos T inmunocompetentes del donante a través del receptor del linfocito T antígeno-específico (Nestel et al, 1992; Hill et al, 2000).

2. Activación, diferenciación y migración de LT aloreactivos del donante a los órganos diana

Las CPA del receptor liberan citoquinas pro-inflamatorias (a destacar la interleucina-2) que actúan como señal para la activación, proliferación y maduración de las células T. Cada vez está mejor establecido el importante rol que tienen estas señales coestimuladoras para facilitar la expansión de los LT, evitando que entren en fase de anergia (Briones et al, 2011). Tras su estimulación y activación, los LT se dividirán y diferenciarán fundamentalmente hacia células citotóxicas capaces de dirigir la respuesta inmune efectora. Para ello, los LT activados migrarán a los órganos diana.

Diversos estudios sugieren que ciertas modificaciones en el endotelio están involucradas en la fisiopatología de la EICR, en especial, la expresión de moléculas de adhesión celular como la selectina-E y la molécula de adhesión vascular-celular. Estas proteínas parecen encargarse de facilitar la llegada de los LT activados a los tejidos diana (fundamentalmente piel, tracto gastrointestinal e hígado) permitiendo así que se produzca una respuesta citotóxica directa en los órganos del receptor (Wysocki et al, 2005).

3. Efectos inflamatorios y celulares: lesión tisular y daño en órganos diana

Mediadores liberados durante la fase 1, activan las células mononucleares fagocíticas y los neutrófilos. Tanto los linfocitos como los macrófagos liberarán el factor de necrosis tumoral -alfa (TNF- α) que produce de forma directa o indirecta un fenómeno de citolisis. Estudios recientes han demostrado que la muerte celular en la EICR se lleva a cabo por un proceso de apoptosis y no de necrosis. Esta observación apoya la participación de los LT citotóxicos y el TNF- α en la fisiopatología de la enfermedad.

Las citoquinas inflamatorias estimulan, a su vez, la producción de nuevas citoquinas por parte de los tejidos dañados. De esta forma, el daño tisular produce una amplificación constante de las señales inflamatorias, perpetuando e incrementando la conocida como “respuesta inflamatoria fisiológica exagerada y fuera de control”.

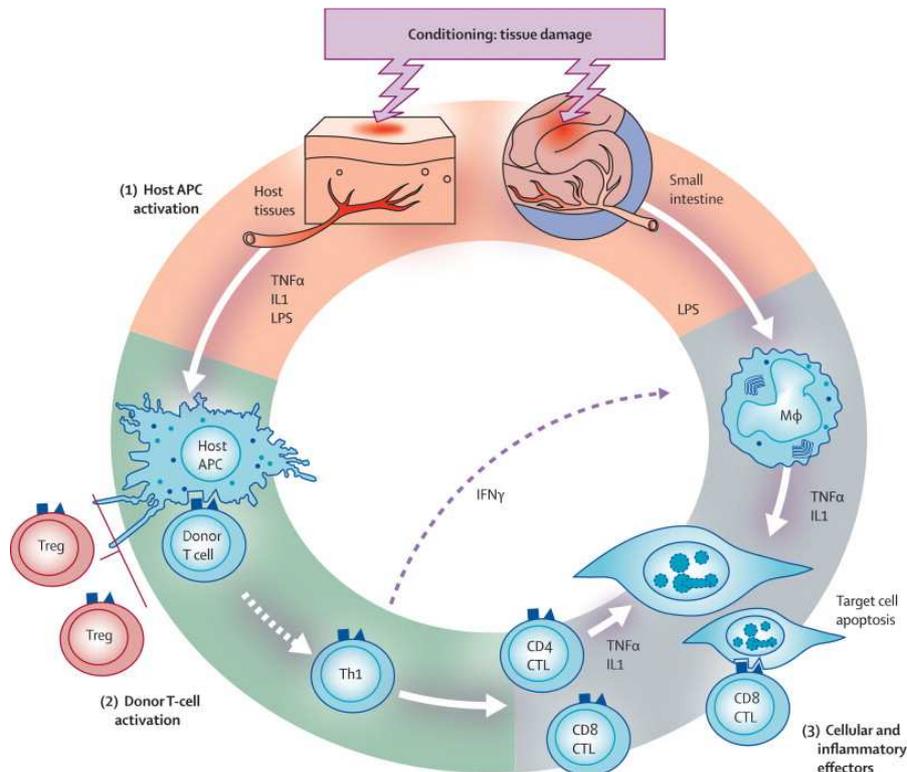


Figura: Fisiopatología de la EICRa. Fases.

Fuente: Ferrara et al, Lancet 2009

Manifestaciones clínicas y forma de presentación de la EICRa

De forma inicial y en base a los resultados preliminares del grupo de Seattle, se definió como EICRa la aparición de manifestaciones clínicas relacionadas con la aloreactividad antes del día +100 del trasplante y EICR crónica (EICRc) cuando aparecía de forma más tardía. Con el paso del tiempo, esta definición puramente temporal se ha mostrado claramente insatisfactoria y ha llevado a la aparición de una nueva clasificación (National Institutes of Health criteriae, Filipovich et al, 2005; Wolff et al, 2011) centrada en la forma de presentación clínica, que incluye la EICRa de inicio tardío (posteriormente al día +100) y el “síndrome de solapamiento” u “overlap-syndrome” que contempla la presencia de características clínicas de EICR aguda y

crónica de forma simultánea. Ambas formas, se ven de forma mucho más frecuente en receptores de alo-TPH con acondicionamiento no mieloablativo y/o tras ILD.

De forma clásica, la piel, el hígado y el intestino se describen como los principales órganos diana en la EICRa. Una revisión de Martin et al, mostraba la presencia de manifestaciones cutáneas en un 81% de los pacientes con EICRa, mientras un 54% presentaban clínica digestiva y un 50% hepática. No obstante, otros órganos diana de la enfermedad incluyen el tejido hematopoyético y el sistema inmune, fundamentalmente médula ósea y timo (Greenblatt et al, 2012) que suelen manifestarse en forma de pancitopenia.

El primer síntoma cutáneo en aparecer suele ser un prurito leve localizado o generalizado. El primer cambio visible en la piel es la aparición de un rash eritematoso o maculopapuloso que suele afectar a la parte superior del tronco, cuello y porción distal de extremidades, particularmente palmas y plantas. Si la enfermedad progresa, las lesiones pequeñas coalescen dando lugar a grandes áreas de eritema que en ocasiones puede llegar a la eritrodermia. Cuando éstas abarcan áreas extensas y dejan amplias zonas de la piel desnudas, la imagen clínica es semejante a la observada en la necrólisis epidérmica tóxica. Los cambios histológicos iniciales son la vacuolización y la necrosis de queratinocitos aislados (células apoptóticas) en la capa basal de la epidermis. A medida que la enfermedad progresa, aumenta el grado de citólisis, aparecen cuerpos eosinofílicos y, finalmente, se desprende la epidermis.

Los síntomas extracutáneos suelen aparecer de forma concomitante a las lesiones en la piel, aunque en ocasiones se presentan de forma aislada. La afección del tracto gastrointestinal se traduce habitualmente en forma de diarrea, típicamente exudativa y a menudo voluminosa (más de 2 litros por día). Cuando se afecta el tracto digestivo superior, predomina la anorexia, así como grados variables de náusea y vómito. La presencia de hemorragia, dolor abdominal intenso e íleo son indicativos de enfermedad grave. A nivel histológico, es importante conocer la frecuente afectación parcheada de la mucosa, que justifica su aspecto normal en muchas de las pruebas endoscópicas realizadas.

La EICR hepática es muy difícil de diferenciar de otras causas de disfunción del hígado como el síndrome de obstrucción sinusoidal hepático, la toxicidad farmacológica, las infecciones virales o la sobrecarga férrica. Es típica la aparición de ictericia, con una marcada elevación en los valores de bilirrubina conjugada, menos intensa de la fosfatasa alcalina y una alteración leve de las transaminasas. El cuadro histológico en el hígado se caracteriza por la necrosis de las células de los conductillos biliares y por la infiltración linfocitaria.

Gradación e impacto pronóstico de la EICRa

Se distinguen varios grados de EICRa en función de la afectación de los diferentes órganos y su gravedad. Existen dos sistemas de gradación clínica que han demostrado en sucesivos estudios su capacidad pronóstica y asociación con los resultados del TPH a largo plazo. Se trata de los sistemas de Glucksberg (Glucksberg et al, 1974) y la revisión del IBMTR (Rowlings et al, 1997). La EICRa severa y muy severa (grados III-IV o C-D) según estas clasificaciones se relaciona con un pronóstico infausto, siendo la supervivencia a largo plazo de entre el 5% y el 25% (Martin et al, 2012).

A pesar de la histórica utilidad de dichas clasificaciones, cabe destacar algunas de sus conocidas limitaciones. Respecto a las manifestaciones digestivas, y especialmente en caso de pacientes ambulatorios, el estadiaje en función de la cuantificación del volumen de diarrea diario es habitualmente complejo. Se incluye además, sin dar detalles específicos, la aparición de náuseas como un síntoma de EICR. Su presencia, habitualmente en asociación con una hiporexia/anorexia marcadas es muy habitual en el post-TPH y en un elevado número de ocasiones multifactorial. Otro aspecto no incluido en las clasificaciones clásicas es la posible afectación hepática por EICR en forma de elevación de transaminasas, que muchas veces no se asocia a aumentos destacables en las cifras de bilirubina.

Tabla 1. Estadíos de la EICR aguda

Órgano	Estadío	Definición
Piel¹	1	< 25% superficie corporal afecta
	2	25-50% superficie corporal afecta
	3	>50% superficie corporal afecta
	4	Eritrodermia generalizada con bullas
Hígado²	1	Bilirrubina 2-3mg/dL
	2	Bilirrubina 3.1-6mg/dL
	3	Bilirrubina 6.1-15mg/dL
	4	Bilirrubina>15mg/dL
Digestivo	1	Diarrea 500-1000ml/día o náuseas persistentes ³
	2	Diarrea 1000-1500ml/día
	3	Diarrea>1500ml/día
	4	Dolor abdominal intenso y/o íleo

1. Usar la regla del 9 para calcular la superficie corporal afecta
2. Bilirrubina total. Si hay causas concomitantes que puedan elevar la Bilirrubina, reducir 1 grado.
3. Náuseas persistentes con evidencia histológica de afectación gástrica y/o intestinal por EICR.

Tabla 2. Grados de afectación de la EICR aguda

GRADO	Estadío piel	Estadío hígado	Estadío digestivo
0	0	0	0
I	1-2	0	0
II	3	1	1
III	-	2-3	2-4
IV*	4	4	-

*El grado IV puede incluir pacientes con afectación menos severa pero marcado deterioro del estado general

Factores de riesgo en la aparición de EICRa

La incidencia de EICRa está directamente relacionada con el grado de disparidad HLA donante-receptor y oscila entre el 35-45% en receptores de PH de hermano HLA idéntico al 60-80% si el donante es no emparentado y con una diferencia HLA (Petersdorf et al; 1995).

El mismo grado de disparidad ocasiona menor EICR si la fuente de progenitores es la sangre de cordón umbilical (CU), oscilando entonces su incidencia entre el 35-65% (Barker et al; 2012). Esto se explica por las propiedades inmunológicas especiales de los PH de sangre de cordón respecto a las células progenitoras maduras obtenidas de médula ósea o sangre periférica. El aloCU contiene una elevada proporción de LT con fenotipo “naive” (CD45RA+/CD45RO-, CD62L+). A su vez, el receptor de quemocina CCR5, expresado por los LT helper 1 es menos abundante en la sangre de cordón. Algunos estudios, han observado además una mayor producción de IL-10, con conocidas propiedades antiinflamatorias, que podrían dificultar también la aparición de EICR (Ballen et al, 2005).

A pesar de la existencia de ciertas discrepancias entre estudios, se han establecido como factores de riesgo clásicos adicionales para el desarrollo de EICR la edad avanzada, tanto del donante como del receptor, la ausencia de una adecuada profilaxis farmacológica, la seropositividad frente a CMV y el recibir PH de una donante mujer en caso de ser varón, en particular si la donante se ha inmunizado previamente, ya sea por transfusiones o embarazos (Flowers M et al, 2011).

En los últimos años, distintos grupos investigadores centran sus esfuerzos en la identificación de factores de riesgo “no clásicos” que permitan una mejor definición del riesgo individual de desarrollo de EICR de cada paciente, de cara a una mejor ajuste del tratamiento profiláctico.

Ejemplos de factores aparentemente implicados en su aparición son los polimorfismos (tanto en receptor como en donante) de genes asociados a la reacción inflamatoria y la respuesta inmune (Chien et al, 2012), el predominio de determinados subtipos celulares, como los LT reguladores (LTreg) (Holtan et al, 2014) o el rol de la microbiota (Manzo et al, 2015).

Diferentes grupos han identificado variantes genéticas, como los polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) así como otros tipos de polimorfismos que influyen el riesgo de EICRa post-TPH. Muchas de estas variantes regulan las funciones de células del sistema inmune, sus receptores, moléculas efectoras, citoquinas y quemoquinas. Algunos resultados sugieren que su evaluación pre-TPH podría anticipar la aparición de efectos adversos en los pacientes, guiar el manejo clínico en aquellos de alto riesgo y quizá servir como dianas para nuevos agentes terapéuticos. A pesar de que estos conceptos han sido acogidos con entusiasmo, la consistencia de los estudios que sugieren estas ideas ha sido cuestionada. La mayor parte de los resultados publicados han sido difíciles de replicar en cohortes independientes y no hay estudios en los que los autores evalúen de forma exhaustiva las variantes identificadas en una misma cohorte. Por tanto, la introducción de estas técnicas en la práctica asistencial estándar precisa de más análisis, incluidos los de todos los polimorfismos identificados como importantes, para la generación de paneles finales realmente útiles en el día a día (Chien et al, 2012).

Actualmente, también es motivo de enorme interés la demostración de que el sistema inmune intestinal y la microbiota digestiva tienen un importante papel no sólo en la protección frente a patógenos sino también en la regulación de procesos metabólicos, por ejemplo, la dirección de la maduración del sistema inmune, al controlar el desarrollo y diferenciación de células NK, la generación de una arquitectura normal en los órganos linfoides secundarios, la diferenciación de los LT reg inducidos y la generación de LB secretoras de inmunoglobulina A (Peled et al, 2016).

Diversos estudios han evidenciado que tras el alo-TPH son habituales modificaciones en la microbiota comensal, con un predominio de *Enterococci* y el cambio aún más prominente en pacientes que posteriormente desarrollan EICR digestiva (Peled J et al, 2016). Jenq et al. observaron tanto en modelos murinos como en pacientes con EICR una clara disbiosis con expansión de Clostridiales y pérdida de Lactobacillales. La reintroducción posterior de una especie predominante de *Lactobacillus* se asoció a una mejora en la EICR.

En esta misma línea, diferentes estudios evalúan el impacto de intervenciones como los antibióticos, los probióticos y los prebióticos en la regulación de la flora digestiva y la reducción de las complicaciones post-TPH (Wang et al, 2015).

La microbiota se revela, por tanto, como uno de los principales targets futuros en la prevención y tratamiento de la EICR, como evidencian también estudios muy recientes evaluando el papel del trasplante fecal en pacientes con EICR refractaria (Kakihana K et al, 2016).

Diagnóstico de la EICRa

El diagnóstico de EICRa se basa en las manifestaciones clínicas, aunque es muy recomendable la confirmación histopatológica. La sintomatología asociada a la EICR (rash maculopapular, náuseas o diarreas...) puede ser francamente difícil de diferenciar de otras causas (p.ej: toxicidad farmacológica, infecciones..). Por ello, en la última década se han realizado esfuerzos en la búsqueda y validación de biomarcadores específicos que confirmen el diagnóstico y faciliten su detección precoz.

En función de sus propiedades biofísicas, los biomarcadores se dividen en transcriptómicos (identificables mediante perfiles de expresión de RNA), proteómicos (estudiándose fragmentos polipeptídicos en orina o plasma) y celulares, que catalogan alteraciones numéricas y funcionales de distintos subtipos celulares. Estudios comparativos que analizan diferentes biomarcadores en pacientes con EICRa respecto a aquellos que no han desarrollado dicha complicación están actualmente en fase pre-clínica. Hasta el momento, no se ha identificado ningún marcador individual satisfactorio en términos de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico o la predicción del desarrollo de EICR. Por ello, varios grupos han propuesto paneles incluyendo diversos biomarcadores que parecen aportar información predictiva sobre la evolución de la EICR, su grado máximo de severidad, la respuesta al tratamiento y la mortalidad asociada. (Levine et al, 2012). Sin embargo, el valor predictivo positivo de estos paneles oscila en el rango del 40-50%, indicando que los “falsos positivos” representan un número similar de casos que los positivos reales.

Además, estudios recientes muestran que la utilidad de algunos biomarcadores previamente reportados como predictivos no se confirma en otras series de casos. Esta inconsistencia puede atribuirse a la gran heterogeneidad entre grupos de pacientes además de a las variaciones en los protocolos y tratamientos evaluados. En espera de más datos y a pesar de la probable utilidad de estos paneles en la práctica clínica, en el momento actual su uso se reserva al ámbito de ensayos clínicos prospectivos (Ali et al, 2016).

Las estrategias de prevención y tratamiento de la EICRa se desarrollan de forma detallada en apartados posteriores de este trabajo al ser dos de los aspectos principales evaluados en los manuscritos que conforman esta tesis doctoral.

3.2.b. Infecciones oportunistas

Los receptores de alo-TPH padecen una profunda alteración de la inmunidad, tanto innata como adquirida, a la que contribuyen diversos factores, entre ellos, déficits relacionados con la enfermedad de base y su tratamiento, la quimioterapia y/o irradiación usadas como acondicionamiento, el desarrollo de EICR y los fármacos utilizados para su prevención y/o control. La lesión tisular con ruptura de barreras mucosas y la inflamación asociada a todos estos factores, favorecen también el desarrollo de infecciones graves. No es de extrañar, por tanto, que las infecciones oportunistas sean una de las principales causas de morbi-mortalidad tras el procedimiento y se describan como la causa responsable de la muerte en un 20% de los pacientes (Williamson et al, 1999; Martino et al, 2001; Bacigalupo et al, 2004).

Gran parte de las complicaciones infecciosas en pacientes trasplantados están relacionadas con microorganismos de origen endógeno, bien por colonización previa por bacterias u hongos que en individuos sanos no comportan problema alguno, o bien por la reactivación de infecciones latentes, fundamentalmente víricas. Aquellos pacientes con comorbilidades como la diabetes o patologías crónicas del tracto digestivo o respiratorio presentan, como es lógico, un mayor riesgo de infección grave.

Existe una clara asociación entre los distintos periodos temporales tras el procedimiento y los agentes más frecuentemente implicados en las infecciones post-TPH, que puede esquematizarse de la siguiente manera:

1. *Periodo de pancitopenia o post-TPH precoz (días 0 a +30)*

Esta fase incluye los días siguientes al trasplante y hasta el momento en que se produce el injerto, periodo en el que el paciente se encuentra generalmente hospitalizado y en régimen de aislamiento. La duración de esta fase de riesgo es variable en función de factores como la intensidad del acondicionamiento o la fuente de progenitores. En este momento, las infecciones se ven facilitadas por la intensa neutropenia, la inmunosupresión y la lesión del tracto digestivo, con un claro predominio de las infecciones de origen endógeno, fundamentalmente bacterianas y micóticas así como las reactivaciones de virus de la familia herpes (Mooney et al, 1993).

Anteriormente al uso generalizado de catéteres intravenosos y de profilaxis antimicrobiana con quinolonas, los principales agentes infecciosos en esta fase eran gérmenes gramnegativos como el *Escherichia Coli* y la *Pseudomonas aeruginosa*, siendo cada vez más habituales las infecciones por *Staphylococcus spp.* y *Streptococcus* alfa-hemolíticos o la colitis por *Clostridium difficile* (Dubberke et al, 2006; Alonso et al, 2012; Satlin et al, 2014).

El aumento en la frecuencia de infecciones por bacterias gramnegativas no fermentadoras y resistentes a la mayor parte de antimicrobianos habituales como *Stenotrophomonas maltophilia* resulta un problema creciente en los últimos años que pone en entredicho las consolidadas estrategias de uso de antibioterapia de amplio espectro de forma prolongada en pacientes neutropénicos (Mikulska et al, 2014).

Las infecciones fúngicas localizadas, habitualmente por *Candida spp.*, con afectación oral y esofágica, han disminuido en gran medida desde la introducción del fluconazol profiláctico (o antifúngicos de espectro más amplio). Menos comunes, aunque mucho más graves, son las candidiasis sistémicas o las infecciones fúngicas invasivas (IFIs) (Bertz et al, 2016; Riches et al, 2016) que se desarrollarán más adelante en este mismo capítulo. Por otra parte, el uso habitual de aciclovir como profilaxis ha supuesto un cambio importante, convirtiendo las estomatitis herpéticas en un problema infrecuente en el momento actual (Yahav et al, 2009).

2. *Periodo post-injerto intermedio (días +30 a +100)*

Durante este periodo el paciente suele haber superado la fase de neutropenia, sin embargo, persiste una profunda disfunción de su inmunidad adquirida, tanto humoral como celular. Es en esta fase cuando suele aparecer la EICR aguda, que precisa de tratamiento corticoideo, lo que determina un deterioro más marcado de la inmunodeficiencia. Las infecciones que cobran protagonismo en este momento son fundamentalmente por citomegalovirus (CMV), poliomavirus BK y en menor grado por *Pneumocystis jirovecii*, *Toxoplasma gondii* u hongos como el *Aspergillus spp.* (Gandhi et al, 2003; Lunde et al, 2015; Blennow et al, 2016). La introducción de estrategias de monitorización rutinaria de la carga viral en sangre total o suero que permiten la instauración de tratamiento precoz o “pre-emptive” ha contribuido en gran medida a la reducción de la morbi-mortalidad asociada a infecciones por CMV o virus de Epstein Barr (VEB) (Ullmann et al, 2016).

3. *Periodo post-injerto tardío (pasados más de 100 días del TPH)*

Lo habitual es que el paso del tiempo se asocie a un menor riesgo de infección, sin embargo es importante destacar que en esta fase más tardía se observa una gran variabilidad inter-individual dependiendo de diversos factores, entre los que destaca el desarrollo de EICR y su tratamiento. En pacientes con esta complicación, es habitual la hipogamaglobulinemia persistente en relación a la inmunodeficiencia humoral, además del déficit celular concomitante. Las infecciones bacterianas por cocos grampositivos y otros gérmenes encapsulados son frecuentes en estos pacientes, quienes tendrán un riesgo incrementado de infecciones víricas, sobretudo por virus respiratorios adquiridos en la comunidad o del

grupo herpes zóster, así como IFIs (Marr et al, 2012; Chemaly et al 2014) asociadas al tratamiento esteroideo prolongado.

El conocimiento generado hasta la fecha ha llevado al establecimiento de una serie de medidas profilácticas encaminadas a disminuir la tasa de infecciones. Diferentes grupos de expertos y organizaciones científicas consensúan y actualizan de forma constante las recomendaciones con mayor grado de evidencia (<http://www.ebmt.org/> ECIL guidelines). Tal y como se ha comentado previamente, algunas de las que han tenido un mayor impacto en la mejora de los resultados del TPH son la monitorización de la infección por CMV o VEB mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la infección por *Aspergillus* con la determinación del antígeno soluble galactomanano en suero, que en combinación con las pruebas de imagen sirven de guía para instaurar tratamiento precoz en pacientes de riesgo (Martino et al, 2002; Piñana et al, 2010). También la aparición de antifúngicos de espectro ampliado, como voriconazol o posaconazol tiene un marcado interés en la prevención y tratamiento de las IFIs (Bow et al, 2015; Ullmann et al, 2016).

No obstante, la aplicación apropiada de todos estos recursos requiere de la comprensión y análisis en profundidad del riesgo individual de cada paciente así como de la epidemiología microbiológica de cada centro. Este conocimiento resultará clave para la formulación de un diagnóstico diferencial apropiado y la introducción de tratamiento empírico correcto ante la aparición de signos o síntomas de infección.

4. Impacto de las complicaciones post-trasplante alogénico

4.1. Prevención de la EICR

4.1.a. Conceptos básicos

La EICR es la complicación más característica y grave del alo-TPH, siendo la principal responsable de la morbi-mortalidad tras este procedimiento y el principal reto para los investigadores en este campo (Vogelsang et al, 1994). La mayor parte de estrategias preventivas centran sus esfuerzos en evitar la aparición de las formas de presentación aguda, que son a su vez el principal factor de riesgo asociado al desarrollo posterior de EICR crónica (EICRc).

De forma continuada y a merced de la profundización en el conocimiento de su fisiopatología se han introducido diferentes estrategias preventivas entre las que destaca, sin duda, la optimización en la selección del donante (compatibilidad HLA, priorización del uso de donantes varones y jóvenes y consideración de la combinación de serologías donante-receptor frente al CMV entre otras) un aspecto clave en la hasta el momento limitada mejora de los resultados en este ámbito.

4.1.b. Antecedentes y estrategias actuales

En la década de los ochenta, tras el reconocimiento del rol fundamental de los LT en la fisiopatología de la EICR, varios grupos demostraron la posibilidad de prevenir su aparición con estrategias de **manipulación del injerto**, ya fuese mediante depleción T in vitro (selección negativa de LT o positiva de células CD34+) (Urbano-Ispizua et al, 1997) o con fármacos linfocitotóxicos administrados al paciente, bien anticuerpos monoclonales (anti-CD52) o policlonales (los conocidos genéricamente como globulinas antilinfocíticas). La mayor parte de estrategias de este tipo tienen como contrapartida el retraso en la reconstitución inmune y su consiguiente incremento en el riesgo de fallo de injerto, recaída e infecciones oportunistas, incluyendo casos de síndrome linfoproliferativo post-TPH asociado al VEB.

Estudios posteriores han intentado solventar estas limitaciones con estrategias de depleción parcial de LT, como la eliminación de subpoblaciones linfocitarias específicas (ej. CD8+) o la titulación de la dosis final de linfocitos presentes en el inóculo. Sin embargo, ninguna de estas modificaciones ha demostrado hasta la fecha mejorar los resultados globales del TPH (Schneidawind et al, Blood 2013).

La administración *in vivo* de anticuerpos dirigidos frente al LT para prevenir la EICR también ha sido ampliamente estudiada. Los fármacos más utilizados son el **Alemtuzumab**, un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al CD52 en la superficie de los linfocitos B y T y la **ATG**. En la actualidad existen tres formas de ATG, (a) ATG de caballo (Pfizer) y (b) 2 tipos de ATG de conejo, la Timoglobulina (Genzyme) y la ATG-Fresenius (Fresenius Biotech). Se trata de sueros compuestos por títulos elevados de anticuerpos policlonales obtenidos tras la aloinmunización de diferentes animales con una línea celular linfoblastoide o timocitos humanos. Un metaanálisis reciente (Theurich et al, 2012) sugiere que la ATG reduce la incidencia de EICRa grado 2-4 (RR 0.68; IC95% 0.55-0.85, p=0.009) y grado 3-4 (RR 0.53; IC95% 0.33-0.85, p=0.0005) así como la aparición de EICRc extensa sin que la MRT (RR 0.82; IC95% 0.55-1.24, p=0.35) ni la supervivencia global se vean modificadas, probablemente a causa de los efectos adversos relacionados con la gran inmunodepresión secundaria. Un ensayo prospectivo y multicéntrico publicado muy recientemente confirma estos resultados (Kröger et al, 2016). En este caso, la introducción de un endpoint adicional, la supervivencia libre de progresión y de EICRc (que se constituiría como un marcador surrogado de una mejor calidad de vida), favoreció al grupo tratado con ATG.

Un aspecto a considerar y que dificulta la evaluación de la eficacia real de este tratamiento es la posibilidad de diferencias en su composición, no solamente entre distintas formas de ATG sino también entre distintos lotes de la misma clase de antisuero (Yañez et al, 2014). Datos recientes remarcan las diferencias en términos de eficacia en función del subtipo de ATG, siendo la obtenida de conejo la más protectora frente al desarrollo de EICRa 2-4 y EICRc (Vo et al, 2015). Como contrapartida, este subtipo se asocia a un mayor número de infecciones oportunistas y quimerismo mixto, con lo que no ocasiona modificaciones finales en la SG. Estos datos remarcan la importancia de no considerar equivalentes los diferentes subtipos del fármaco en la práctica clínica ni hacer extrapolaciones simplistas de resultados obtenidos en estudios concretos.

En una encuesta reciente realizada por el EBMT (Passweg et al, 2016) un 75% de los centros participantes referían haber introducido el uso de ATG peri-acondicionamiento en sus protocolos clínicos, fundamentalmente en receptores de trasplante de DNE. En la práctica asistencial, la mayor parte de centros utiliza timoglobulina a dosis de 7.5 mg/kg (rango, 4-32 mg/kg) administrada en 2-4 días entre el -8 y el -1, aunque existe una nueva corriente que propone que dosis aún menores podrían ser más apropiadas (Binkert et al, 2015).

Sin embargo, con los datos disponibles, no es posible hacer recomendaciones específicas sobre el uso general de ATG, que deberá individualizarse según las características del paciente y la plataforma de TPH utilizada. La evidencia más clara a favor de su uso se da en receptores de alo-TPH de DNE con acondicionamiento mieloablativo. En cambio, su rol en el aloTIR está aún por definir al no haber sido evaluado formalmente en este contexto, donde el éxito del TPH es mucho más dependiente de un EICT intacto. Por tanto, son necesarios ensayos randomizados prospectivos para clarificar su papel.

A pesar de que, como hemos visto, la manipulación del injerto sigue considerándose de gran interés, siendo su aplicación habitual en muchos centros, la profilaxis más utilizada de forma clásica se basa en el uso de fármacos inmunodepresores que se inician durante el peri-trasplante y suelen mantenerse durante unos meses para facilitar la “tolerancia inmunológica” (Storb R et al, 1985; Perreault C et al, 1989).

El **metotrexato** (MTX), un antagonista del ácido fólico con capacidad citotóxica que a dosis bajas produce efectos antiinflamatorios mediante la atenuación de los LT, fue el primer fármaco evaluado en la profilaxis de EICR en los años setenta (Storb R et al, 1970). Ante los buenos resultados en modelos animales su uso en monoterapia pasó a ser la prevención habitual de la EICR en humanos. Como principal problema asociado, cabe destacar su importante toxicidad hepática, renal y mucosa que comporta que sólo dos tercios de los pacientes reciban dosis plenas del tratamiento inicialmente planificado (Sugita et al, 2012).

La **ciclosporina A** (CsA), que inhibe la calcineurina, un enzima citoplasmático crítico en la activación del LT, se obtuvo del hongo *Tohyopcladium inflantum* a finales de los sesenta. Fue inicialmente testada como tratamiento antifúngico con escaso éxito y no fue hasta una década después cuando se introdujo en la profilaxis de la EICR con eficacia similar al MTX en estudios prospectivos.

La mejora drástica en los resultados del TPH aconteció en 1986, cuando se publicaron los primeros estudios mostrando mejoras del injerto y descenso de la EICRa grado 2-4 con el uso de esquemas combinados de tratamiento incluyendo CsA y MTX en comparación a la monoterapia con cualquiera de ellos (Mrsic et al, 1989).

Los efectos secundarios más frecuentes de la CsA incluyen la insuficiencia renal y la neurotoxicidad (temblores, parestesias, sensación de quemazón en pies y manos...).

Son habitualmente dosis-dependientes y reversibles con el descenso o retirada del fármaco. Aunque poco frecuentes, la encefalopatía posterior reversible y la microangiopatía trombótica asociada al trasplante (MAT) son sus dos toxicidades potencialmente más severas.

Otros efectos adversos incluyen la hipertensión arterial, la hiperbilirubinemia, hiperglicemia, dislipemia, hipomagnesemia, hiperpotasemia, cefalea e hirsutismo, hipertrofia gingival, debilidad ungueal, acné, náuseas y vómitos.

La CsA se metaboliza por el sistema enzimático CYP3A4 hepático y su eliminación es fundamentalmente por vía biliar (95%), con el resto de fármaco eliminado por vía urinaria. Es muy importante recordar que su eliminación puede verse alterada por la coadministración de fármacos que inhiben o inducen el sistema enzimático del citocromo P450, como algunos antifúngicos azólicos, la metoclopramida y diversos antibióticos (Duncan et al, 2006), con lo que, durante el tratamiento con CsA es fundamental tener en cuenta las interacciones que pueden favorecer la aparición de toxicidad.

El **tacrolimus** (FK506), un macrólido, fue descubierto en 1984 a partir de la fermentación del *Streptomyces tsukubensis*. A pesar de ser estructuralmente diferente a la CsA, su mecanismo de acción es muy similar, como también lo son su eficacia clínica y perfil de toxicidad. A diferencia de la CsA, que se une a la proteína citosólica ciclofilina (Peptidilprolilcic-trans-isomerasa A), el tacrolimus lo hace a la Peptidilprolilcic-trans-isomerasa FKBP12, que también comporta una potente inhibición de la activación de los LT al frenar la transcripción de la IL-2.

Este inmunodepresor fue inicialmente utilizado en la prevención y tratamiento del fallo de injerto en trasplante de órgano sólido (TOS), donde se objetivó que su actividad era entre 50-100 veces mayor que la de la CsA. Posteriormente, tres ensayos clínicos randomizados y un meta-análisis mostraron reducciones en la incidencia global de EICRa con tacrolimus-MTX en comparación con CsA-MTX, sin cambios en la EICRc ni la SG (Ratanatharathorn et al, 1998; Nash et al, 2000; Hiraoka et al, 2001; Ram et al, 2009).

Sin embargo, el debate sobre si ambos inmunodepresores son equiparables o no sigue abierto, especialmente a raíz de la publicación de un nuevo ensayo clínico aleatorizado que no muestra diferencias significativas entre ambos fármacos tras optimizar los niveles target de CsA, que eran subóptimos en estudios previos (Kanda et al, 2016). A pesar de ello, a raíz de los primeros resultados descritos con tacrolimus, bastantes centros europeos incorporaron su uso como estándar, particularmente en el alo-TPH de DNE. Son necesarios nuevos análisis que aleatoricen CsA y tacrolimus y obtengan los niveles target apropiados de ambos fármacos para extraer conclusiones definitivas sobre este aspecto.

El **micofenolato mofetilo** (MFM) inhibe la proliferación de los LT, los LB y la producción de anticuerpos mediante su acción sobre la síntesis de purinas. Algunos estudios de finales de los noventa mostraron la eficacia de la combinación CsA-MFM como prevención de la EICR tras alo-TIR (McSweeney et al, 2001).

Varios estudios prospectivos posteriores han comparado MFM y MTX (siempre en combinación con CsA) y observado una incidencia similar de EICRa con ambos esquemas, con aparente mejoría en la velocidad de adquisición del injerto hematopoyético y menor severidad de la mucositis en el grupo de MFM (Piñana et al, 2010; Kharfan Dabaja et al, 2014). La importancia de acortar al máximo la fase de neutropenia y reducir la toxicidad han convertido al MFM en un fármaco de especial interés en el trasplante de sangre de cordón y el alo-TIR.

El **sirolimus**, también conocido como rapamicina, es un macrólido producido por el actinomiceto *Streptomyces hygorscopicus* que también se utilizó inicialmente como profilaxis en receptores de TOS. Su estructura es similar a la del tacrolimus pero su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la vía mTOR, que bloquea la entrada en ciclo celular de los LT naïve mediante la inhibición de la producción de IL-2. Dos de las características diferenciales que le confieren un especial interés son su aparente inhibición selectiva de los LT aloreactivos con preservación de los LT reguladores y su actividad específica anti-linfomatosa (Peccatori et al, 2015).

Un meta-análisis reciente (Wang et al, 2015) de 5 ensayos clínicos randomizados muestra la capacidad de sirolimus de disminuir la incidencia de EICRa 2-4 sin comportar cambios significativos en la aparición de EICRa 3-4 y EICRc. El análisis de toxicidad revela un aumento en la incidencia de síndrome de obstrucción sinusoidal en receptores de TPH mieloablativo sin diferencias en la aparición de MAT. Tampoco se describe un impacto en la supervivencia libre de progresión ni en la SG. El estudio concluye que los regímenes de profilaxis basados en el uso de sirolimus son eficaces y seguros.

La combinación sirolimus-tacrolimus se ha mostrado especialmente eficaz en receptores de alo-TIR (Pérez-Simon et al, 2013), al conducir a una reducción en la tasa de EICRc y una mejoría en la SG. El daño endotelial asociado a la coadministración de ambos fármacos, con un posible ascenso en el número de MAT es el principal factor limitante que hace que algunos centros se muestren cautos en su uso rutinario (Labrador et al, 2014).

La utilidad de los **corticoides** en la EICR está relacionada con su actividad linfólítica y su capacidad para inhibir la producción de citoquinas inflamatorias. Su papel se ha centrado fundamentalmente en el tratamiento de la EICR y no en su profilaxis. No obstante, un meta-análisis de datos de 5 estudios randomizados en pacientes con alo-TPH mieloablativo mostró que la adición de corticoides a la profilaxis con CsA-MTX disminuía la aparición de EICRa grado 2-4 de forma significativa pero se asociaba a un incremento destacable en la incidencia de infecciones oportunistas (Quellmann et al, 2008) y no comportaba un impacto en los resultados finales del TPH, incluida la aparición de EICRc.

Sin embargo, un estudio reciente de Chang et al. vuelve a abrir el debate sobre su utilidad en escenarios concretos. En él, se incluyeron 228 pacientes que recibieron un trasplante haploidéntico y se estratificaron en función de su riesgo de desarrollo de EICRa según dos biomarcadores ($>1.9 \times 10^6/\text{kg}$ células NK CD56+ bright y $\text{ratio CD4:CD8} > 1.16$ en el injerto). Los pacientes considerados de bajo riesgo recibieron la profilaxis EICR estándar mientras que los de alto riesgo se aleatorizaron a recibir la profilaxis estándar (grupo control) o a su combinación con esteroides. El estudio alcanzó el objetivo primario al demostrar una disminución significativa de la aparición de EICRa en los pacientes de alto riesgo que recibieron corticoides en la profilaxis en comparación con el grupo de alto riesgo control (21 vs. 48%, respectivamente). Además, la exposición a corticoides en los 100 primeros días post-TPH fue similar en los grupos de bajo riesgo y de alto riesgo con profilaxis con corticoides y mayor en los pacientes de alto riesgo del grupo control. Estos datos no se asociaron a un impacto final en la MRT o la SG. Por tanto, la adición de corticoides a la profilaxis estándar parece una opción interesante en casos concretos y debería seguir bajo evaluación en ensayos clínicos comparativos.

Ciclofosfamida post-TPH

En 1963, Berenbaum publicó los primeros estudios que evaluaron la ciclofosfamida en modelos murinos de TPH. Fue el grupo del Hospital Johns Hopkins el pionero en la introducción de este fármaco en la profilaxis en humanos con su administración a dosis de 50 mg/kg los días +3 y +4 post-TPH. Este agente alquilante clásico administrado en el post-TPH precoz permite el establecimiento de un quimerismo mixto estable donde coexisten células del donante y el receptor a pesar de la presencia de marcadas diferencias HLA entre ambos y en asociación a bajas tasas de EICR, especialmente crónica.

Su efecto se basa en que las células aloreactivas rápidamente proliferativas son más sensibles a la acción de la ciclofosfamida al tener una menor capacidad de reparación del DNA, con desbalance a favor de los LTreg. De forma contraria, las células madre hematopoyéticas, ricas en aldehído-deshidrogenasa, son resistentes a su acción, por lo que el fármaco puede ser administrado tras el alo-TPH sin dañar el injerto ni comprometer la reconstitución inmune (Al-Homsi et al, 2015).

Múltiples estudios centran sus esfuerzos en definir de forma clara las plataformas de TPH que optimizan el potencial de la ciclofosfamida. A pesar de que los estudios iniciales han evaluado su uso en combinación con otros inmunosupresores, como inhibidores de la calcineurina o MFm y en el marco del haplo-TPH, hay abierta una interesante línea de investigación que analiza su papel en otros escenarios, especialmente como profilaxis única en trasplante de DE o DNE con compatibilidad HLA 10/10.

4.1.c. Nuevas dianas

Como se ha descrito con anterioridad, el extenso conocimiento actual sobre la patogenia de la EICR, obtenido en su mayor medida gracias a modelos animales, ha permitido identificar varias dianas prometedoras para su prevención y tratamiento. Estas estrategias se basan en un profundo conocimiento de los mecanismos inmunológicos y su validación en modelos pre-clínicos. Entre las más prometedoras se incluyen la actuación en la interacción LT- CPA, el bloqueo de las moléculas co-estimuladoras del LT, el control de la producción de citoquinas proinflamatorias y la actuación sobre el tráfico del LT a los órganos diana. Sin embargo, lo más probable es que la optimización de los resultados finales requiera de la combinación de estos distintos abordajes.

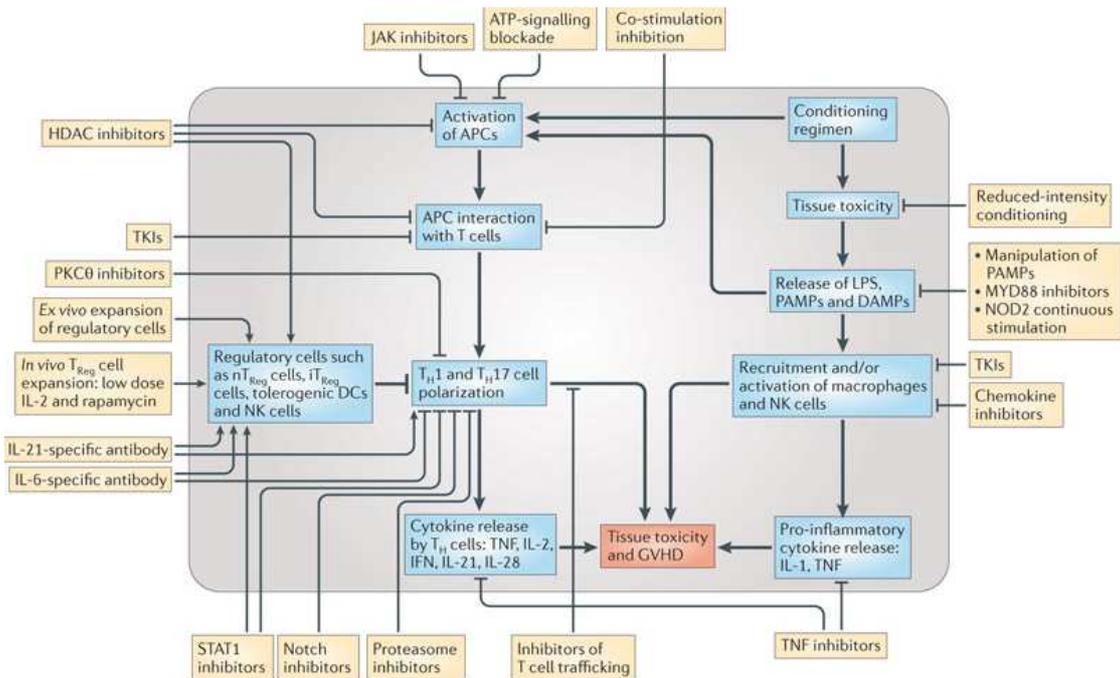


Figura: Visión general de las estrategias más prometedoras para el control de la EICR

Fuente: Blazar et al, Nat Rev Immunol. 2012

La siguiente tabla incluye, de forma resumida, los nuevos abordajes en estudio, su mecanismo de acción principal y la situación actual de los ensayos clínicos que los evalúan.

Categoría	Agente	Mecanismo de acción	Ensayos/referencias
Actuación sobre el LB	Rituximab	Anti-CD20	Fase II. van Hoef , 2013
	Belimumab	Inhibición BAFF	Fase II
	Baminercept	Bloquea diferenciación linfoide en el centro germinal	Fase II
Bloqueo coestimulación	Alefacept	Inhibición interacción LFA3–CD2	Fase I-III. Shapina, 2009
Bloqueo transducción del LT	Ruxolitinib	Inhibición JAK-2	Fase II. Zeiser, 2015
	Bortezomib	Inhibición del proteasoma	Fase II. Moran, 2012
	Vorinostat	Inhibición acetilación histonas	Fase II. Choi, 2014.
Migración del LT	Maraviroc	Inhibición de CCR5	Fase I-II. Khandelwal 2016,
Actuación sobre citoquinas	Etanercept/Infliximab	Inhibición TNF α	Fase II.A lousi, 2009.
	Daclizumab/Basiliximab	Inhibición receptor IL-2	Fase IV. Hamidieh, 2012.
	Tocilizumab	Inhibición receptor IL-6	Fase II. Rodaly, 2016.
	IL-2 recombinante	Dosis bajas inducen LT reg	Fase II. Kim, 2016.
Terapia celular	Infusión LTreg	Inhibición activación LT	Fase I-II. Rezvani, 2006.
	Células mesenquimales	Inmunomodulación	Fase I-III Polchert, 2008.
	Infusión células NK	Inhibe LT aloreactivos, induceTregs	Fase I. Olson, 2010.
	LT con genes suicida	Depleción de LT activados	Fase I-II. Jones, 2014.
Alteración del microbioma	Rifaximina	Antimicrobiano	Fase I. Weber, 2016.
	<i>Lactobacillus</i> spp	Probióticos	Fase I. Ladas, 2016.
Otros	Atorvastatina	Expansión LT reg, inhibición Th1	Fase II . Rotta, 2010.
	Azacitidina/Decitabina	Agentes hipometilantes: inhibición CPA, anergia LT, expansión LTreg	Fase I/II- Goodyear, 2012.

Adaptada de Blazar et al, Nat Rev Immunol. 2012

4.1.d. Papel de la CsA en el éxito del TPH. Optimización de su manejo.

A pesar del gran interés que despierta todo el arsenal de nuevas estrategias en investigación, por el momento ninguna de ellas ha sido aprobada para su introducción en la práctica asistencial diaria y, tal y como evidencia la encuesta reciente del EBMT (Passweg et al, 2016), la mayor parte de centros de TPH considera todavía la CsA como pilar principal en la prevención de la EICR ya sea en combinación con MTX en receptores de TPH mieloablatoivo o con MFm tras alo-TIR. A pesar de la dilatada experiencia de uso con este fármaco, su manejo óptimo no está bien establecido, tal y como evidencian las sustanciales diferencias en su dosificación, niveles target y esquemas de infusión en los diferentes centros (Passweg et al, 2016).

Esta complejidad se explica en parte por la considerable variabilidad farmacocinética del fármaco, tanto intra como inter-paciente, y su índice terapéutico relativamente estrecho. Las diferencias en su absorción oral están bien documentadas y pueden comportar discrepancias marcadas en la biodisponibilidad, de entre el 20 al 50%, en distintos pacientes (Cooney et al, 1997). Además, el aclaramiento de CsA es también muy distinto en función de múltiples factores. Aspectos demográficos, como el peso corporal o la edad, interacciones medicamentosas, polimorfismos genéticos relacionados con el metabolismo renal y hepático o la unión del fármaco a proteínas plasmáticas, el tipo de TPH y el momento desde su realización son algunos de los más influyentes.

Esta constelación de factores lleva a pensar que una monitorización estrecha de los niveles de CsA en sangre es imprescindible para optimizar su eficacia y reducir su toxicidad.

El primer estudio que relacionó la inmunodepresión y el riesgo de EICRa fue llevado a cabo por Gluckman et al. en 1985. Se trataba de un análisis general, que mostraba una mayor incidencia de EICRa en pacientes con poca inmunodepresión. Poco después, en 1988, el grupo de Seattle confirmó estos hallazgos y mostró que los niveles bajos de CsA en sangre podían comportar un aumento del riesgo de EICRa y debían ser monitorizados y ajustados de forma continuada tras el TPH (Yee et al, 1988).

Hasta la fecha, sin embargo, distintos aspectos relacionados con su forma de administración, dosis y estrategia de monitorización todavía son motivo de debate, dados los resultados discordantes entre estudios.

Método de medición

La experiencia en TOS señala el área bajo la curva (ABC) como uno de los parámetros farmacocinéticos más interesantes en la medición de la eficacia de los inhibidores de calcineurina (Grevel et al, 1989). Su estimación es compleja, requiere de la recogida seriada de muestras sanguíneas y de la aplicación de modelos estadísticos de farmacocinética poblacional (Willemze et al, 2008) que permiten predecir los valores para cada individuo y en cada momento concreto a través del estudio de los niveles nadir del fármaco, la dosis administrada, el tiempo desde el TPH, el peso corporal y la edad del paciente. Esta estrategia tan laboriosa es difícilmente aplicable en la práctica asistencial diaria. Por ello, varios estudios, también en el ámbito del TOS, han evaluado otros puntos temporales como marcadores surrogados del ABC. Las concentraciones valle o nadir se han convertido en el método más utilizado, al tratarse de una estrategia de limitada complejidad y sencilla instauración en los laboratorios de los centros de TPH (Ghalie et al, 1994; Punnett et al, 2007).

Algunos grupos describen la concentración sanguínea de CsA a las 2 o 5 horas tras su administración (C2 o C5) como parámetros más apropiados a monitorizar (Grant et al, 1999; Duncan et al, 2006). Así como en receptores de TOS parece demostrado que tanto la C2 como el ABC son más útiles para medir el nivel de inmunodepresión que los niveles valle, en el caso del alo-TPH no hay datos suficientes para considerar un método mejor que otro. De hecho, la C2 no ha mostrado relación con la aparición de EICRa en pacientes adultos (Barkholt et al, 2007).

Por otra parte, estudios comparando la capacidad predictiva de los niveles valle de CsA y el ABC, únicamente establecieron correlaciones entre la aparición de EICR y los niveles valle (Ringden et al, 1996; Willemze et al, 2008), concluyendo que una adecuada profilaxis frente a EICR depende en mayor medida de la presencia en sangre de una concentración del fármaco suficiente en todo momento que de la dosis total de fármaco a la que el sujeto ha estado expuesto. Parecen imprescindibles nuevos ensayos que comparen de forma detallada la concentración de CsA en varios puntos temporales, para identificar el punto de control óptimo para las modificaciones de dosis.

Dosis inicial

Otro de los aspectos de interés evaluado en algunos estudios es el papel de la dosis inicial de CsA administrada. La mayor parte de centros, inician el fármaco vía endovenosa y a una dosis de 3 mg/kg/día dividida en 2 administraciones (Passweg et al, 2016). Algunos grupos de trasplante pediátrico han tratado sin embargo de desarrollar guías clínicas incorporando las conocidas diferencias farmacocinéticas existentes entre individuos y no únicamente el peso para

alcanzar de forma más rápida los niveles deseados del fármaco (Jin et al, 2008). En pacientes entre 9 y 17 años la dosis media que predecía el alcance del ABC objetivo (4200 mcg xh/l) fue de 2.1 +/- 1.21mg/kg (IC95% 1.29-2.92mg/kg) que equivaldría a 68 +/- 35 mg/m². Estos datos evidencian que tener en cuenta la edad del paciente y la superficie corporal (SC) en lugar del peso permite un mejor ajuste de la concentración del fármaco en niños, en los que está claramente establecida la asociación entre la SC, el volumen del hígado y el metabolismo hepático (Murry et al, 1995). Hasta la fecha, ningún estudio ha mostrado datos similares en pacientes adultos.

Tiempo de infusión

Mientras algunos grupos han reportado que la perfusión continua de CsA mejora los resultados respecto a su administración en 2-3 horas dos veces al día otros estudios muestran resultados discordantes (Ogawa et al, 2004).

Un aspecto a considerar y que puede explicar estas diferencias es la utilización de un mismo rango terapéutico en pacientes tratados con diferentes formas de perfusión. En aquellos con infusiones continuadas del fármaco, la variación de la concentración en sangre del fármaco es mínima durante el día y puede evaluarse independientemente del momento. Sin embargo, la relación entre el valor nadir tras la perfusión continua respecto a la administración dos veces al día no están del todo claras. En este sentido, Nakamura et al. reportaron que el nivel basal de CsA durante la perfusión continua debía ser 2.55 veces mayor al deseable tras perfusiones cortas para llevar a una misma ABC.

Estudios posteriores considerando estos datos evidenciaron que pacientes con CsA en perfusión continuada y niveles target de 250-400 ng/ml presentaban una mayor incidencia de EICRa que aquellos que recibían el fármaco dos veces al día con nivel nadir deseado entre 150-300 ng/ml (Ogawa et al, 2004).

Día de inicio y vía de administración

Algunos estudios (Lamparelli et al, 1997; Dini et al, 1998) sugieren que un inicio precoz de la CsA (día -7) puede mejorar los resultados a largo plazo del TPH. Este efecto se explicaría por la presencia de niveles correctos del fármaco en un mayor número de pacientes el día del trasplante, con reducción de la liberación de citoquinas inducida por el tratamiento de acondicionamiento y control de la activación precoz de LT aloreactivos. Sin embargo, estos resultados no se han confirmado en estudios posteriores.

De forma opuesta, Barrett et al. no detectaron beneficio alguno con el inicio precoz de CsA (-4) respecto a su instauración en el día -1. El inicio de retirada del tratamiento en el día +100 si

mejoraba los resultados respecto a hacerlo en el +50. Un ensayo clínico randomizado (Lanino et al, 2009) evaluando este aspecto en 152 pacientes pediátricos tampoco logró demostrar la asociación del inicio precoz de la CsA con la reducción en la aparición de EICRa. Los autores refieren que un posible factor confusor en el estudio fue la administración de ATG a un número elevado de los pacientes incluidos, que mitigaría el efecto protector de la administración precoz de la CsA.

En la práctica, un 95% de los centros participantes en la encuesta del EBMT (Passweg et al, 2016) refieren iniciar la CsA vía endovenosa, siendo lo más habitual introducirla en el día -1 (75%). No obstante, hay diferencias marcadas entre centros, con casos de inicio en los días -3 (10%), -7, -6 y 0 (1% en cada grupo).

Frecuencia de monitorización

No existen estudios que evalúen de forma específica el impacto del número de determinaciones semanales del fármaco en sangre y su asociación con un mayor porcentaje de pacientes en el rango terapéutico deseado. En la práctica, la mayor parte de centros, inician la monitorización de CsA con entre 1 y 3 mediciones por semana durante el primer mes para continuar con evaluaciones semanales o coincidentes con los controles ambulatorios del paciente.

Rango terapéutico

Como se ha comentado previamente, también en este aspecto hay diferencias sustanciales entre los diferentes centros. Así como algunos marcan diferentes valores “target” para receptores de donante emparentado y no emparentado (Jin et al, 2008) la mayor parte no hace salvedades en función del tipo de TPH.

Sí parece más claro que en el momento de establecer el rango terapéutico deseado, debe tenerse en cuenta si la administración del fármaco se hace de forma continuada o en periodos cortos de infusión (Ogawa et al, 2004).

Las guías más recientes del EBMT y la European Leukemia Net (ELN) recomiendan una concentración diana de CsA entre 200-300 ng/ml si su administración es dos veces al día y de entre 400-600 ng/ml si se administra en perfusión continuada (Machishima et al, 2013).

En pacientes con enfermedades de alto riesgo podría considerarse un nivel target más bajo (250-400 ng/ml), que se ha asociado a menores tasas de recidiva en algunos estudios (Oshima et al, 2008).

En esta misma línea de individualización del tratamiento se centró un estudio en pacientes pediátricos (Martin et al, 2003) que mediante el uso de datos antropométricos, las dosis y momento de administración de CsA, la duración de la infusión y los niveles del fármaco detectados en sangre estimaba posteriormente los valores farmacocinéticos individuales con un método Bayesiano. El “target” se acababa de ajustar en función de si se consideraba prioritaria la prevención de la EICR (entre 100-150 ng/ml) o la reducción del riesgo de recidiva (60-100 ng/ml).

4.1.e. Justificación del Manuscrito número 1

Uno de los ámbitos de mayor interés actual en el campo del alo-TPH es la optimización de la intensidad y duración de la inmunodepresión de acuerdo a la percepción del riesgo de EICR y recidiva de cada individuo.

Los estudios realizados hasta la fecha han mostrado resultados contradictorios al evaluar la asociación entre las concentraciones plasmáticas de los inhibidores de calcineurina, la incidencia de EICRa y su impacto final en la supervivencia. Mejor conocido es el hecho de que el desarrollo de EICRa y/o crónica se asocia a un descenso del riesgo de recidiva, probablemente relacionado con el EICT.

Sin embargo la EICRa moderada y severa comporta una morbi-mortalidad relacionada con el procedimiento excesiva y se necesita más información para encontrar el regimen de inmunodepresión que la evite manteniendo el EICT (Peters et al, 2000).

Uno de los principales motivos que explican la ausencia de conclusiones claras sobre el papel real de la CsA en el TPH es la gran heterogeneidad en las poblaciones incluidas en los estudios, que suelen evaluar pacientes de características muy diferentes, tratados con diferentes tipos e intensidades de regímenes de acondicionamiento, fuentes de progenitores hematopoyéticos y formas de administración y ajuste de los inmunodepresores.

El primer trabajo incluido en esta tesis, se gestó con el objetivo de minimizar la mayor parte de estas limitaciones y evaluar el impacto real de la CsA en las primeras semanas posteriores al trasplante con acondicionamiento no mieloablativo, en el que la modulación del EICT con un manejo óptimo de la inmunodepresión juega un papel clave en los resultados del procedimiento. El estudio analiza una cohorte uniforme de pacientes que recibieron CsA endovenosa tras un alo-TIR de progenitores hematopoyéticos de hermano HLA idéntico, con sangre periférica movilizada como fuente de PH y tratamiento de acondicionamiento basado en fludarabina.

El objetivo principal del estudio fue evaluar si las concentraciones de CsA durante las 4 primeras semanas post-TPH se relacionaban con la incidencia de EICR, la nefrotoxicidad, la MRT y la supervivencia global de los pacientes. La homogeneidad de la muestra, junto al uso de políticas específicas de inicio, dosificación y modificación de la inmunodepresión permiten atribuir con mayor confianza los hallazgos finales al efecto independiente de la CsA.

Consideramos muy importante la generación de nuevos datos que amplíen la información práctica sobre el uso de CsA y permitan extrapolar de forma más fidedigna las conclusiones obtenidas a subgrupos concretos de pacientes. Teniendo en cuenta la gran heterogeneidad vigente en términos de dosificación, momento de inicio y duración del tratamiento con CsA entre los diferentes centros de TPH y el potencial impacto que algunas de estas modificaciones comportan en los resultados finales del procedimiento no parece éste un tema zanjado.

4.2. Tratamiento de la EICR aguda

4.2.a. Conceptos básicos

A pesar del uso estándar de profilaxis con agentes inmunodepresores o estrategias de manipulación del inóculo ya descritas en apartados anteriores de este trabajo doctoral, entre el 30 y el 50% de los receptores de alo-TPH desarrollarán EICRa en los primeros meses post-TPH. Esta complicación constituye uno de los mayores obstáculos al potencial curativo del procedimiento.

Teniendo en cuenta su fisiopatología, la modulación de los LT aloreactivos efectores es el objetivo principal de su tratamiento. Sin embargo, otras poblaciones celulares, incluyendo los LT reguladores, las células dendríticas, los linfocitos NK o los LB así como otros mecanismos implicados en la lesión tisular o endotelial representan dianas prometedoras a las que dirigir el tratamiento (Wolf et al, 2012).

Aunque durante los últimos 30 años se han testado múltiples agentes como tratamiento sistémico de la EICRa ninguno está aprobado con esta indicación por la US Food and Drug Administration (FDA). Uno de los principales factores que explican esta situación es la falta de estandarización de los estudios clínicos realizados hasta la fecha, tema que trataremos en más detalle a lo largo de este capítulo.

La decisión de iniciar tratamiento sistémico depende no solamente de la severidad de las manifestaciones clínicas sino también de su velocidad de progresión. Existen tratamientos tópicos o no absorbibles que se utilizan en caso de afectación exclusiva y poco extensa de la piel o el tracto digestivo. La progresión rápida de la alteraciones o la afectación de más órganos (grado II o superior) requiere de la introducción de tratamiento sistémico sin demora. A su vez, suele mantenerse el tratamiento profiláctico que el paciente estaba recibiendo.

La supervivencia a largo plazo de los pacientes se relaciona de forma directa con la respuesta al tratamiento inicial, ya que, tal y como se comentará en detalle más adelante, los tratamientos de segunda línea presentan tasas elevadas de fracaso terapéutico, toxicidades muy significativas, fundamentalmente en relación a complicaciones infecciosas, y se asocian a un pronóstico infausto. En términos generales, alrededor de un tercio de los pacientes con EICR grado 2-4 responden al tratamiento inicial, con lo que muchos pacientes precisarán de tratamiento de rescate.

Diferentes grupos han publicado sus resultados en el manejo de la EICRa refractaria, con gran variabilidad de estrategias en este escenario y sin progreso en los resultados obtenidos. Los tratamientos de rescate no solamente se muestran ineficaces en un grupo muy amplio de pacientes sino que incrementan en gran medida la inmunodepresión y el riesgo de infecciones fatales.

A pesar de que la mayor parte de guías recomiendan el uso de dosis altas de metilprednisolona o prednisona como tratamiento inicial de la EICRa, también en este escenario existen diferencias entre centros en la dosis inicial de corticoides administrada, la asociación de otros agentes inmunodepresores de forma precoz y la forma de descender los esteroides tras la mejoría clínica. Hasta la fecha, no se ha logrado identificar los factores predictores de respuesta al tratamiento primario con corticoides (Weisdorf et al, 1991; McMillan et al, 2002).

A la luz de esta enorme variabilidad de manejo, la Sociedad Americana de Trasplante Hemopoyético (ASBMT) publicó recientemente unas recomendaciones (Martin et al, 2012) con tres objetivos principales: 1) servir como guía introductoria de tratamiento de la EICRa, 2) establecer una red de trabajo para evaluar la calidad de los estudios previamente publicados, 3) recomendar puntos de evaluación útiles como marcadores surrogados de respuesta y SG a introducir en futuros estudios.

En ellas, los autores remarcaban la importancia de aplicar las recomendaciones teniendo siempre en cuenta la situación individual de cada paciente y recordando que ninguno de los fármacos incluidos está aprobado con esa indicación por la FDA, con lo que deben solicitarse siempre en forma de “uso compasivo”. Por último, y en ausencia de una evidencia suficiente para recomendar medidas concretas, la revisión ofrecía consideraciones generales en el tratamiento.

4.2.b.Tratamiento sistémico de primera línea en la actualidad

La metilprednisolona (MP) a dosis de 2 mg/kg/d o la prednisona 2-2.5 mg/kg/d es el tratamiento de primera línea aceptado como estándar para pacientes con EICRa grado 2-4. Al mismo tiempo, suele continuarse con la medicación profiláctica que se estaba administrando.

Dosis inicial de corticoides

Varios estudios han evaluado las tasas de respuesta en función de la dosis inicial de esteroides administrada. Uno de los más conocidos es un ensayo prospectivo randomizado de un grupo italiano (van Lint et al, 1998) que comparaba la administración de metilprednisolona 10 mg/kg/d durante cinco días con posterior descenso de dosis frente al uso del fármaco a dosis de 2 mg/kg/d. No se observaron diferencias en las tasas de respuesta inicial (28% vs. 30%) y la SG fue similar en ambos grupos. Los mismos investigadores (van Lint et al, 2006) trataron años después una serie de 211 pacientes con EICR grado I-IV con MP 2 mg/kg/d. Un 71% de los enfermos presentaron una respuesta precoz al tratamiento que permitió el descenso progresivo de MP cinco días tras su inicio. Los pacientes sin respuesta rápida se aleatorizaron a recibir MP a dosis de 5 mg/kg/d durante 10 días en monoterapia o en combinación con ATG. No hubo diferencias significativas en las tasas de respuesta entre ambos grupos y se evidenció la ineficacia del uso de dosis mayores de 2 mg/kg/d de MP en pacientes no respondedores. Se constató además un aumento del 2% en el riesgo de muerte por cada ascenso de 1mg/kg en la exposición acumulativa a MP.

Conociendo estos datos, un objetivo importante en el manejo de la EICR es minimizar las complicaciones asociadas a las dosis altas de esteroides. En esta línea, algunos centros han evaluado el inicio de MP en dosis de 1 mg/kg/d en pacientes con afectación digestiva alta aislada y poco intensa (grado IIa) con ascenso de dosis a 2 mg/kg/d en caso de progresión después de tres días de tratamiento. Un estudio retrospectivo analizando 733 pacientes (Mielcarek et al, 2009) en los que se compararon dosis iniciales de 1 y 2 mg/kg/d no mostró diferencias en los resultados finales del TPH y sí permitió una reducción del 50% en la dosis acumulada de esteroides en el primer grupo. Una de las limitaciones del estudio fue el bajo número de pacientes incluidos con EICR grado III-IV, lo que no permite extrapolar estas conclusiones a casos con manifestaciones clínicas graves. Aunque prometedora, esta estrategia precisa de confirmación en estudios prospectivos.

Otro estudio randomizado mostró la utilidad de la adición de esteroides no absorbibles, como la beclometasona o la budesonida, para reducir la dosis sistémica de MP en pacientes con manifestaciones predominantemente digestivas y leves (Hockenbery et al, 2007).

Las recomendaciones del ASBMT concluyen por tanto que la administración de MP como tratamiento inicial en pacientes con EICR en dosis mayores de 2.5 mg/kg/d no comporta ventajas y que los pacientes con EICR grado IIa, pueden tratarse con dosis de 1 mg/kg/día, aunque esta afirmación no es extrapolable a casos con afectación más severa.

Descenso de los esteroides

Existe muy poca información sobre la forma óptima de descender los esteroides una vez evidenciada una mejoría clínica. Un estudio aleatorizado (Hings et al, 1993) dividió en dos grupos a los pacientes con respuesta a MP en el día +14 de tratamiento. En el primero, se realizó una retirada rápida de la PDN (86 días) y en el segundo el descenso se hizo de forma más paulatina (147 días). Los rebotes de la clínica durante la retirada de corticoides y la aparición posterior de EICRc no fueron diferentes en los dos grupos. Por tanto, la forma óptima de descenso de esteroides sigue sin estar claramente definida y debe iniciarse tan pronto como las manifestaciones clínicas de EICR muestran una mejoría clara. Se recomienda un descenso aproximado del 10% de la dosis (0.2 mg/kg/d) cada 3-5 días hasta llegar a dosis de 20-30 mg/día, momento en que la retirada será todavía más lenta. Un descenso más rápido estará indicado en pacientes con infecciones activas o toxicidad importante asociada al tratamiento.

Tratamiento inmunodepresor combinado en primera línea

Debido a que un número importante de pacientes con EICRa no responden al tratamiento con esteroides y que muchas de las respuestas iniciales no son duraderas, es de especial interés la evaluación de los resultados con esteroides asociados a otros agentes como tratamiento inicial.

Un meta-análisis reciente (Rashidi et al, 2016) ha evaluado los datos agregados de diferentes ensayos clínicos randomizados que compararon el tratamiento de primera línea de la EICRa 2-4 con esteroides en monoterapia respecto a su combinación con otros agentes inmunodepresores. Entre éstos se incluyeron ATG, daclizumab (un inhibidor del receptor de la interleucina-2), infliximab (que actúa en la vía del TNF alfa), pentostatina y MFM. Los resultados no demostraron un beneficio del tratamiento combinado. De hecho, la supervivencia en el día +100 fue menor en el grupo con inmunodepresión doble (y también al año del TPH, aunque en este caso sin significación estadística). A pesar de las claras limitaciones asociadas a la comparación de grupos heterogéneos, estos resultados van en contra del aumento en la intensidad del tratamiento inicial en pacientes con EICRa. Un aspecto remarcable es el bajo número de pacientes con formas severas de EICR (0-33% en los diferentes estudios) incluidos en el metaanálisis con lo que estos resultados no son extrapolables a pacientes de muy alto riesgo.

Con estos datos, los corticoides en monoterapia son todavía el tratamiento de primera línea. La inmunosupresión combinada debe limitarse por el momento a pacientes incluidos en ensayos clínicos fase II-III que incluyan, idealmente, el análisis de biomarcadores para identificar de forma precoz los casos con afectación de alto riesgo y mayor probabilidad de refractariedad a esteroides (Levine et al, 2012).

4.2.c. Refractoriedad a esteroides

Considerando la limitada respuesta de la EICRa al tratamiento de primera línea, con respuestas duraderas y completas en menos del 40% de los pacientes y una mortalidad de más del 70% en caso de refractoriedad a esteroides, nuevas estrategias en el tratamiento de segunda línea son fundamentales. Un enfoque común hasta la fecha ha sido tratar a los pacientes con agentes que se han mostrado eficaces en la prevención y/o el tratamiento del rechazo tras TOS.

Varios aspectos ayudan a explicar el fracaso de estos fármacos, útiles en la profilaxis, en el tratamiento de la EICR: 1) dado el conocimiento de la fisiopatología de la EICR es evidente que prevenir el inicio (profilaxis) de una respuesta aloinmune es una cosa, e interrumpir una cascada inflamatoria ya iniciada (tratamiento) es mucho más complejo, 2) a pesar de que el mecanismo de acción de un fármaco puede ser apropiado para su uso como tratamiento, cuando un paciente desarrolla EICR bajo profilaxis con este agente, es poco probable su eficacia con fines terapéuticos, 3) aunque la aloreactividad se asocia a la EICR y los inmunodepresores son útiles para prevenir su aparición, esta aloreactividad relacionada con los LT es deseable para permitir el injerto, 4) en función del periodo post-TPH en que aparece la EICR, el perfil de citoquinas, poblaciones celulares y lesión tisular son muy distintos y estas diferencias pueden condicionar la respuesta a las distintas opciones y líneas de tratamiento (Deeg et al, 2007).

Una cuestión clave es concretar la “refractoriedad a esteroides” que marca el inicio del tratamiento de rescate. Hasta la fecha, los criterios no han sido definidos de forma sistemática, pero es obvio que tanto la severidad como la duración de las manifestaciones clínicas deben tenerse en cuenta para considerar a un paciente como refractario a esteroides. La tendencia actual es realizar evaluaciones precoces de la situación que permitan el inicio rápido del tratamiento de segunda línea en pacientes de alto riesgo.

Se considera intensificar la inmunodepresión por respuesta subóptima a corticoides en los siguientes supuestos: 1) progresión de las manifestaciones clínicas en al menos un grado global tras 3 días de corticoides a dosis plenas, 2) ausencia de al menos mejoría de un grado global tras 5-7 días de tratamiento, 3) respuesta incompleta tras 2 semanas de MP. Otro grupo en el que considerar el inicio precoz de un tratamiento de rescate serán los pacientes con intolerancia o importante toxicidad asociada a los corticoides a dosis altas (Martin et al, 2012). En pacientes con afectación leve (grado IIa) puede ampliarse el intervalo de observación hasta las dos semanas.

Mecanismos de resistencia a corticoides

Tal y como describieron Barnes y Adock en el 2009, la resistencia a corticoides ha sido caracterizada en otras enfermedades inflamatorias como el asma bronquial, la artritis reumatoide o la colitis ulcerosa. Los linfocitos circulantes de los sujetos córtico-resistentes presentan una capacidad de proliferación y liberación de citocinas reducida (Farrell et al, 2003; Chikanza et al, 2004; Hew et al, 2006). Otros estudios han analizado los mecanismos moleculares que lo explican, entre los que se encuentran: 1) alteración de la afinidad del receptor de corticoides por fosforilación mediada por las quinasas MAP p38, JAK3 y JNK; 2) descenso en la expresión de la quinasa MKP-1, que en condiciones normales ejerce un efecto inflamatorio; 3) inhibición del receptor de corticoides por nitrosilación o ubiquitinización; 4) aumento en la expresión del receptor de corticoides beta, que compite con la forma activa alfa en la unión a elementos de respuesta; 5) activación de AP1 (proteína activadora 1), que se une al receptor de corticoides y previene su interacción con elementos activadores; 6) anomalías en la acetilación de histonas; 7) aumento en la expresión de la glicoproteína P, que media el transporte de corticoides fuera de la célula; 9) aumento en la expresión de MIF (factor inhibidor de la migración macrofágica) que inhibe los efectos antiinflamatorios mediados por MKP-1 (Pidala et al, 2010).

Estos mecanismos moleculares, evidenciados en otras enfermedades inflamatorias podrían tener relevancia en la fisiopatología de la EICR refractaria, sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios específicos en este escenario.

4.2.d. Tratamiento de rescate en la actualidad

Muy pocos estudios prospectivos han comparado la eficacia y seguridad de los diferentes tratamientos de rescate. La mayor parte de datos provienen de estudios retrospectivos de series reducidas de centros únicos o ensayos en fase II con un sólo brazo de tratamiento. La comparación de resultados es muy compleja, además faltan endpoints estandarizados y existe gran heterogeneidad en los pacientes incluidos (Martin et al, 2012).

Los anticuerpos, policlonales o monoclonales, son los agentes más utilizados. Existe experiencia desde hace más de 3 décadas con **ATG**.. Las respuestas globales oscilan entre el 30 y el 56%, con tasas de RC del 8-36% (Dugan et al, 1997; Remberger et al 2001, Arai et al, 2002). En la mayor parte de estudios la eficacia es mayor en la afectación cutánea y con la instauración precoz del agente (McMillan et al, 2007). La supervivencia a largo plazo es baja, debido a progresión de la EICR, morbi-mortalidad infecciosa y síndrome linfoproliferativo post-TPH (SLP-PT) asociado a VEB (Curtis et al, 1999).

El **alemtuzumab**, ampliamente utilizado para depleción de LT en profilaxis, se ha probado también como tratamiento de rescate de la EICR refractaria (Wandroo et al, 2004; Carella et al, 2004). Dado que el anticuerpo depleciona tanto LT como LB el riesgo de SLP-PT es bajo. Con todo, según la dosis utilizada, el riesgo de infecciones particularmente víricas es un problema muy importante (Chakraberti et al, 2002).

Gómez-Almaguer et al. mostraron una respuesta global al fármaco del 83%, con un 33% de RC y supervivencia media no alcanzada y de 8 meses en los pacientes con RC y RP, respectivamente. Estos prometedores resultados no se confirmaron en un estudio posterior de Martínez et al., con menor proporción de respuestas y supervivencia a largo plazo muy pobre. Estas diferencias pueden explicarse en parte por la inclusión de pacientes de mayor edad en el segundo estudio (37 vs. 57 años) y con formas más severas de EICR (56% vs. 100% de grados 3-4). En cualquier caso, en ambos estudios, las infecciones oportunistas fueron uno de los principales problemas.

Una diana de interés para los anticuerpos monoclonales (AcMo) es la subunidad alfa del receptor de la IL-2 (CD25) que se expresa de forma muy prominente en los LT activados. Anticuerpos quiméricos, como el **inolimomab** o el **daclizumab** bloquean su señal y así la proliferación del LT. Algunos ensayos clínicos prospectivos (Anasetti et al, 1994; Willenbacher et al, 2001; Bordigoni et al, 2006) han analizado su eficacia en la EICR refractaria. Las respuestas globales oscilan entre el 40 y el 67%, con tasas de RC del 8 al 47%, mejores en caso de afectación cutánea aislada. Las tasas de supervivencia a largo plazo son limitadas y las complicaciones infecciosas son el principal problema ya que representaron la causa principal de muerte en el 11-60% de los pacientes.

Una estrategia para incrementar la eficacia de los AcMo es unirlos a una inmunotoxina que se libera de forma específica en las células diana. El **denileukin diftotox** es un ejemplo de esta estrategia y está constituido por una proteína recombinante que asocia el complejo IL-2 humano a los dominios catalíticos y de membrana de la toxina diftérica. Este agente es selectivo frente a los linfocitos T activados, que expresan niveles altos del receptor de la IL-2. Tras su unión específica al LT, la toxina entra en la célula, inhibe su síntesis proteica y produce su apoptosis. Un ensayo clínico fase I mostró una marcada eficacia del fármaco en la EICR refractaria (Ho et al, 2004) con respuestas globales del 71% en el día +29 y un 33% de RC. La transaminitis fue la toxicidad más frecuente, afectando al 26% de los pacientes.

El papel de los antagonistas del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), una citoquina involucrada en la citotoxicidad celular, especialmente en el tubo digestivo, también ha sido motivo de estudio en la EICR refractaria. El **infliximab** es un AcMo quimérico que se une tanto a la subunidad soluble como a la transmembrana del TNF α .

Algunas series de casos y estudios retrospectivos (Yamame et al, 2003; Couriel et al, 2004; Pidala et al, 2009) han descrito tasas de respuesta globales del 50-67% y RC en un 15-62% de los casos. Esta amplia variabilidad en los resultados se asocia claramente al número de pacientes incluidos con formas de afectación más severa. La SG oscila entre el 6 y el 38% y se relaciona de forma directa con la respuesta al fármaco. El **etanercept**, es una proteína de fusión formada por el ligando extracelular de unión del receptor del TNF y la porción Fc de la IgG1 humana y también se ha mostrado eficaz en casos de EICR refractaria (Busca et al, 2007).

Otro anticuerpo monoclonal murino en estudio, **begelomab**, se dirige e inhibe la señal del antígeno CD26, que se expresa en alrededor de un 10-60% de los LT CD4+ circulantes. Su eficacia, muy prometedora en estudios preliminares, se encuentran ahora en evaluación en un ensayo clínico randomizado fase II-III.

De forma paralela al desarrollo de ensayos clínicos con AcMo e inmunotoxinas, tanto viejos como más novedosos agentes quimioterápicos/inmunomoduladores se han utilizado también en el tratamiento de la EICR refractaria con cierto éxito. Tal y como se ha descrito con anterioridad, el **MFM** tiene una actividad clara en la profilaxis de la EICR. Existe controversia sobre su interés en el tratamiento primario de esta complicación en combinación con corticoides (Alousi et al, 2009; Martin et al, 2009). Su uso en el ámbito de la EICR refractaria se ha evaluado en series retrospectivas de casos y en algún ensayo prospectivo de pequeño tamaño (Kim et al, 2004; Furlong et al, 2009). Las respuestas globales oscilaron entre el 31-67% con RC en el 15-31% de los pacientes. La SG a 2 años fue del 33% al 40%.

También el **sirolimus** se ha evaluado en este escenario. En un estudio piloto, Benito et al. reportaron resultados prometedores (respuesta global 57%, RC 24%) pero una toxicidad farmacológica no desdeñable que con relativa frecuencia comportó la suspensión del tratamiento. Posteriormente, dos series retrospectivas (Ghez et al, 2009; Hoda et al, 2009) en que se ajustó la dosis del fármaco según sus niveles sanguíneos mostraron mejores resultados con respuestas globales del 76-91% y completas del 44-86%. En los tres estudios la MAT constituyó una complicación frecuente a vigilar, que afectó a un tercio de los sujetos. La SG a un año osciló entre el 41 y el 44% y se asoció de forma clara a alcanzar una RC con el tratamiento.

Otro agente usado en el tratamiento de la EICR es la **pentostatina**. Este análogo de nucleósido inhibe la adenosina deaminasa y causa un acúmulo de 2'-deoxiadenosina 5'-trifostato (dATP) que disminuye la producción de IL-2 y lleva a la apoptosis linfocitaria. Bolanos-Melade et al. examinaron su eficacia en un ensayo clínico fase I. La respuesta global fue del 77% con RC en un 63% de casos. La media de supervivencia fue de 85 días con un elevado número de muertes por rebotes de la EICR, infecciones oportunistas y/o fallo multiorgánico.

El **tacrolimus** y la **CsA** pueden ser de utilidad en pacientes que no han sido previamente expuestos a estos fármacos como parte del regimen profiláctico. El cambio de CsA a tacrolimus no se ha mostrado útil, excepto en casos en que el motivo de sustitución fue la neurotoxicidad (Furlong et al, 2000).

A diferencia de la fototerapia externa (**PUVA**), que se ha mostrado efectiva sólo en casos de afectación cutánea leve (Furlong et al, 2002), la **fotoféresis extracorpórea** (FEC) que se basa en la exposición de las células mononucleadas en sangre periférica a la radiación UV-A tras el tratamiento previo con 8-metoxipsoraleno y la posterior reinfusión de las células inactivadas al paciente, ha mostrado resultados prometedores en pacientes con afectaciones más severas. Su eficacia se basa en sus efectos en la activación de las CPA, en la alteración de la producción de citocinas, con predominio de la respuesta Th2 y el aumento de los LT reg. Se trata de un tratamiento bien tolerado en pacientes hemodinámicamente estables. Las respuestas globales a 3 meses oscilan entre el 67 y el 75%, con RC del 52 al 60%. Aparentemente, los resultados son mejores en casos de afectación cutánea (RC 60-76%) respecto a la hepática (27-67%) y sobretodo la digestiva (0-75%) y cuanto menor sea el grado de afectación global (Greinix et al, 2000; Perfetti et al, 2008).

Otras estrategias de terapia celular se han probado en el tratamiento de la EICR refractaria. Tanto la transducción de **LT con genes suicida**, como el uso de **células mesenquimales** o **LT reg** estan en fases muy preliminares que no permiten extraer conclusiones sobre su eficacia y aplicabilidad (Bonini et al, 1997; Sudres et al, 2006) .

Los pobres resultados obtenidos con el tratamiento de rescate a pesar de la introducción de nuevos inmunodepresores y AcMo en las 3 últimas décadas han llevado a los investigadores a probar tratamientos combinados. Kennedy et al. evaluaron de forma retrospectiva la eficacia de diferentes combinaciones de tratamiento (ATG, tacrolimus, etanercept +/-MFM) y obtuvieron una tasa de respuesta global (81%) destacable, con un 69% de RC. Sin embargo, este aumento de respuestas no se asoció a mejora significativa en la SG en comparación a una cohorte histórica de pacientes tratados con ATG y tacrolimus. Rao et al. analizaron la eficacia de la combinación de daclizumab e infliximab en una serie de pacientes pediátricos. La tasa de respuesta global fue del 86% (RC 63%). Con una media de seguimiento de 31 meses, la SG fue del 68% sin un aumento destacable en el riesgo de infecciones graves con el tratamiento combinado.

La limitada experiencia en el uso de más de un fármaco como rescate no permite recomendar su uso rutinario. Sin embargo, el hecho de que algunos estudios muestren aumentos en la tasa de respuesta sin una clara asociación con mayor toxicidad y/o muerte por infección o recaída convierte esta estrategia en una estrategia de interés.

Se necesitan nuevos estudios para identificar si alguna combinación específica de inmunodepresores permite realmente mejorar los resultados frente al tratamiento con monoterapia. No es el caso en un trabajo reciente publicado por Lenneke et al. en el que la combinación de etanercept e inolimomab como tratamiento de rescate se asoció a una supervivencia de sólo un 10% a los 2 años.

En el trabajo del ASBMT (Martin et al, 2012), la tasa de respuesta y la supervivencia a los 6 meses de iniciado el tratamiento de rescate fueron similares con los diferentes inmunosupresores usados en segunda línea. Tampoco existe suficiente evidencia como para contraindicar ninguno de los fármacos. La información disponible se considera insuficiente para definir el manejo estándar y la selección del tratamiento de rescate debe basarse en el tratamiento previo y consideraciones sobre la potencial toxicidad e interacciones de los posibles agentes. Otros factores, como la familiaridad del equipo médico con el tratamiento indicado, su experiencia previa con dicho esquema y sus costes deben también incluirse en la toma de decisiones. Por supuesto, dada la ausencia de un tratamiento estándar, siempre que sea posible se ofrecerá a estos pacientes la participación en ensayos clínicos.

4.2.e. Mejoras en el diseño de nuevos estudios sobre EICR

De lo indicado se desprende que existe una necesidad imperiosa de ensayos clínicos prospectivos que evalúen el papel de los diferentes agentes de segunda línea (Martin et al, 2012); las deficiencias de diseño que deben evitarse están cada vez mejor establecidas. Deben definirse de forma muy clara los criterios de inclusión y evitar los sesgos de selección. También es muy importante que el esquema de administración, tanto del tratamiento en estudio como del grupo control, sean consistentes. Se aplicarán definiciones claras de “refractariedad a corticoides” así como criterios objetivos para la evaluación de la respuesta, que faciliten la comparación entre estudios. A su vez, deben formularse de forma adecuada las hipótesis nula y alternativa y evitar análisis de cohortes de pacientes muy pequeñas con limitado poder estadístico. Además, se tendrá siempre en cuenta la medicación concomitante. En el análisis de resultados deberán considerarse factores de confusión características basales como la edad, la fase de la enfermedad al TPH o el grado de disparidad HLA, además del grado de afectación y la línea de tratamiento de rescate evaluada.

Varios grupos han propuesto la respuesta global (RC + RP) en el día +28 como mejor momento para evaluar la eficacia del tratamiento (objetivo primario) en los futuros estudios, al ser el aspecto que mejor parece relacionarse con la supervivencia a largo plazo (Levine et al, 2010; Saliba et al, 2012). También se considera un excelente indicador la supervivencia a 6 meses sin

necesidad de introducción de un nuevo inmunodepresor. Sobrevivir 6 meses con EICR activa es muy infrecuente y la mayor parte de muertes por infecciones oportunistas aparecen de forma temprana, mientras que los resultados a más largo plazo pueden estar condicionados por otros factores como el desarrollo de EICR crónica. Otros indicadores como la enfermedad libre de progresión, la MRT o la SG no incluyen el uso de terceras líneas de tratamiento y son, por tanto, menos específicos al evaluar la eficacia de un agente concreto frente a la EICRa.

Tal y como se ha comentado previamente, el progreso irá también de la mano de la profundización en el conocimiento de la biología de la refractariedad a esteroides. La generación de estudios de expresión génica que identifiquen los receptores de alo-TPH con predisposición a la resistencia a esteroides permitiría el uso de terapias dirigidas a revertir mecanismos específicos de resistencia o al uso precoz de tratamiento combinado en pacientes de riesgo.

4.2.f. Justificación del Manuscrito número 2

A pesar de la necesidad del diseño de nuevos ensayos clínicos de calidad en el ámbito de la EICR refractaria, es a su vez importante describir los resultados de series amplias de pacientes de “la vida real” para evitar sesgos de selección y sobreestimación de los resultados de eficacia de algunos fármacos. Por tanto, revisiones retrospectivas como la reportada en el Manuscrito 2 de este trabajo doctoral, en que se evalúa la eficacia de inolimomab en los pacientes con EICRa refractaria moderada y/o severa, sirven de ayuda para determinar si los resultados globales de los ensayos clínicos son realmente extrapolables.

4.3. Complicaciones infecciosas y EICRa

4.3.a. Conceptos básicos

Tal y como se ha descrito previamente, el alo-TPH comporta una alteración muy importante en el sistema inmune, tanto innato como adquirido y por tanto, un riesgo muy marcado de aparición de infecciones graves. Algunos estudios muestran que las infecciones son la causa responsable del fallecimiento de un 35-45% de los pacientes alotrasplantados (Ninin et al, 2001) y la adecuada reconstitución inmune se mantiene como un problema muy significativo a medio y largo plazo.

Así como las células NK aumentan de forma rápida post-TPH y vuelven en poco tiempo a su rango normal (Dokhelar et al, 1981) las deficiencias en la inmunidad humoral y celular se observan en diferente profundidad en todos los receptores de alo-TPH durante un periodo de tiempo variable. Uno de los aspectos más destacables, es el marcado desequilibrio entre los LT helper/supresores y los citotóxicos que todavía no se comprende por completo (Bacigalupo et al, 1981) y podría asociarse a la aloreactividad. El timo juega un papel muy importante en la reconstitución de la inmunidad T. La edad avanzada de los pacientes tiene un impacto negativo en la generación de LT naive CD4+, probablemente en relación a la involución tímica asociada a la senescencia. La función de los LT en adultos dependerá fundamentalmente de la expansión periférica de las escasas células T del donante presentes en el injerto y la reconstitución inmune será generalmente más tardía que en los niños, hasta alcanzar cifras normales a los 2-3 años post-TPH en gran parte de los casos.

La inmunodeficiencia celular tiene como resultado una pobre respuesta de los LT citotóxicos a aloantígenos y mitógenos, además de un descenso en la función de los LT CD4+. Los déficits humorales se asocian especialmente a escasez en las subclases IgG2 e IgG4. El cambio en la producción de Ig primaria (IgM) a secundaria (IgG) se ve también alterado y las respuestas antígeno-dependientes son anormales y comportan una inapropiada producción de anticuerpos.

Young et al, publicaron recientemente los resultados de un ensayo clínico fase 3, multicéntrico y randomizado (Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network [BMT CTN] 0201) evaluando receptores de alo-TPH de DNE de médula ósea (MO) vs. sangre periférica (SP). De un total de 499 pacientes incluidos en el estudio en los que se disponía de datos completos sobre infecciones, se objetivaron un total de 1347 episodios de infección, con un 77% de los pacientes con al menos un evento catalogado como moderado o severo.

Un 53% de los cuadros graves sucedieron en la cohorte de MO y un 47% en la de SP, lo que resultó en una incidencia acumulada (IAC) a 2 años del 84.7% (IC95% 80-90) para la MO

versus 79.7% (IC95%: 74- 85) para la SP (P = .013). La mayor parte de los episodios fueron secundarios a infecciones bacterianas (60%), con una IAc a 2 años del 72.1% y el 62.9% respectivamente (P = .003). No se observaron diferencias en las tasas de infección vírica y fúngica entre ambas cohortes.

La quimioterapia intensiva y la irradiación producen un daño tisular del tracto digestivo que permite la translocación bacteriana a la circulación sistémica. Esto resulta en la estimulación del sistema inmune del receptor, que aumentará la producción de citoquinas. Estadísticamente, es complejo analizar la asociación entre bacteriemia y EICRa dado que la EICR es por si misma un factor de riesgo para el posterior desarrollo de infecciones bacterianas sistémicas. No obstante, algunos grupos (Poutsika et al, 2011) han demostrado que la aparición de bacteriemias en la fase inicial post-TPH se asocia a un riesgo aumentado de EICRa grado II-IV.

Desafortunadamente, otros estudios evaluando el uso de profilaxis antibacteriana más intensiva con antibióticos de amplio espectro como piperacilina/tazobactam, meropenem o vancomicina no tuvo impacto sobre la incidencia posterior de EICR (Kroschinsky et al, 2002; Perez-Simon et al, 2004).

Un aspecto de creciente interés es el marcado aumento en la incidencia de infecciones por bacterias resistentes a antibióticos, asociado a la presión selectiva secundaria al mayor uso de antibióticos de amplio espectro (Roca et al, 2015). Estos cambios tienen una especial trascendencia en el ámbito de la hematología, ya que los pacientes con hemopatías muy frecuentemente reciben profilaxis y tratamiento antimicrobiano durante periodos de tiempo muy prolongados (Mikulska et al, 2014). Algunos datos muestran que las bacteriemias por gérmenes multiresistentes se asocian a una mortalidad de entre el 36-95% en receptores de TPH alogénico (Kim et al, 2014; Girmenia et al, 2015).

Un estudio recientemente publicado por Bilinski et al, evaluó de forma prospectiva la tasa de colonización digestiva de un total de 107 pacientes consecutivos receptores de un alo-TPH entre 2010 y 2013. Se determinó la presencia de: *S. aureus* meticilin-resistente (MARSa), enterococos resistentes a vancomicina, enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro ampliado (BLEA) y enterobacterias productoras de carbapenemasas. En el momento del TPH, un 31% de los pacientes estaban colonizados (21% por bacterias grampositivas resistentes a vancomicina, 20% por gramnegativas tipo BLEA y 6% por gramnegativas resistentes a carbapenem). Dieciocho pacientes presentaban más de un patógeno resistente y un 14% adicional había sido portador en el último año pero no lo era en el momento del TPH.

La incidencia de EICRa grado II-IV fue más alta en los pacientes colonizados (42% vs 23%, $p < 0.05$), fundamentalmente en términos de afectación gastrointestinal (33% vs 13.5%, $p = 0.07$).

Un 69% de los enfermos presentaron alguna infección en el post-TPH precoz. Las causas más frecuentes de infección bacteriana fueron los estafilococos coagulasa negativo (37%), seguidos por los enterococos resistentes a vancomicina (17%) y la *K. pneumoniae* BLEA (15%). La SG fue menor en el grupo colonizado (34% vs. 74% a los 2 años, $p < 0.001$), siendo la colonización por gérmenes resistentes el único factor con un impacto significativo en los resultados globales del TPH en el análisis multivariado. Este impacto negativo en la supervivencia se debió a un aumento significativo en la MRT en los pacientes colonizados (42% vs. 11% a 2 años, $p = 0.001$). Las infecciones fueron la causa más frecuente de muerte en el estudio (45%), con marcadas diferencias entre el grupo de pacientes colonizados y los no colonizados (67% vs. 29% del total de exitus). Un aspecto final a remarcar es que los pacientes no colonizados en el momento del TPH, pero con resultados positivos en el año anterior al procedimiento presentaron resultados similares al grupo de pacientes no colonizados.

En la actualidad existe un enorme interés por comprender el papel de la microbiota intestinal en la iniciación de la cascada de reacción alérgica. Ya hace unos años se evidenció que la descontaminación anaeróbica era un factor predictor de la aparición de EICR grado II-IV (HR 1.7, $p < 0.05$) (Beelen et al, 1992). Posteriormente, un estudio prospectivo randomizado mostró una mayor frecuencia de formas moderadas y severas de EICR en pacientes tratados únicamente con ciprofloxacino respecto a los que recibían ciprofloxacino y metronidazol. Estos resultados se atribuyeron a la eficacia de metronidazol en la reducción del riesgo de colitis por *C. difficile*, que se había reconocido como un factor de riesgo claro para el posterior desarrollo de EICR digestiva (Alonso et al, 2012).

A pesar de que la descontaminación digestiva parece reducir el riesgo de EICRa, ya se ha hablado previamente en este capítulo de la asociación entre el uso extendido de profilaxis antibiótica y la aparición de bacterias resistentes, que produce a su vez desequilibrios en la microbiota. Por ello, el tipo de fármacos a administrar y su duración deben evaluarse con detenimiento. De hecho, algunos grupos interesados en el estudio del microbioma muestran que la abundancia de bacterias del género *Blautia*, un agente comensal muy frecuentemente aislado en el tubo digestivo humano, protege frente al desarrollo de EICR severa (Jenq et al, 2014). Otros grupos destacan la pérdida de diversidad bacteriana asociada al uso de antibióticos sistémicos, que es especialmente marcada en pacientes con EICR digestiva (Holler et al, 2014).

Con estos datos, y en espera de varios estudios en marcha que permitirán profundizar en este tema, algunas intervenciones como el tratamiento antibiótico específico en pacientes colonizados, la manipulación de la flora comensal digestiva mediante administración de *Lactobacillus*, la introducción de tratamientos dirigidos a vías de señalización de la respuesta inmune innata, como los antagonistas de TLR2 (Sava et al, 2014) y/o intervenciones nutricionales específicas (Gerbitz et al, 2004) resultan muy prometedoras y deberían evaluarse en ensayos clínicos prospectivos.

Algunos grupos han demostrado que no sólo algunas infecciones bacterianas, sino también fúngicas pueden inducir el desarrollo de EICR gracias a la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Van der Velden et al, 2013). Son conocidas a su vez las interacciones entre infecciones víricas y el rechazo del injerto en TOS o el desarrollo de EICR, que parecen mediadas por LT aloreactivos específicos frente a virus que producen reacciones cruzadas (Cainelli et al, 2002; Fuji et al, 2013). Por todo ello, es probable que un adecuado manejo de la profilaxis y tratamiento antimicrobiano durante los distintos períodos de riesgo post-TPH resulte beneficioso, no solamente para reducir la muerte por infección, sino también la asociada a EICR.

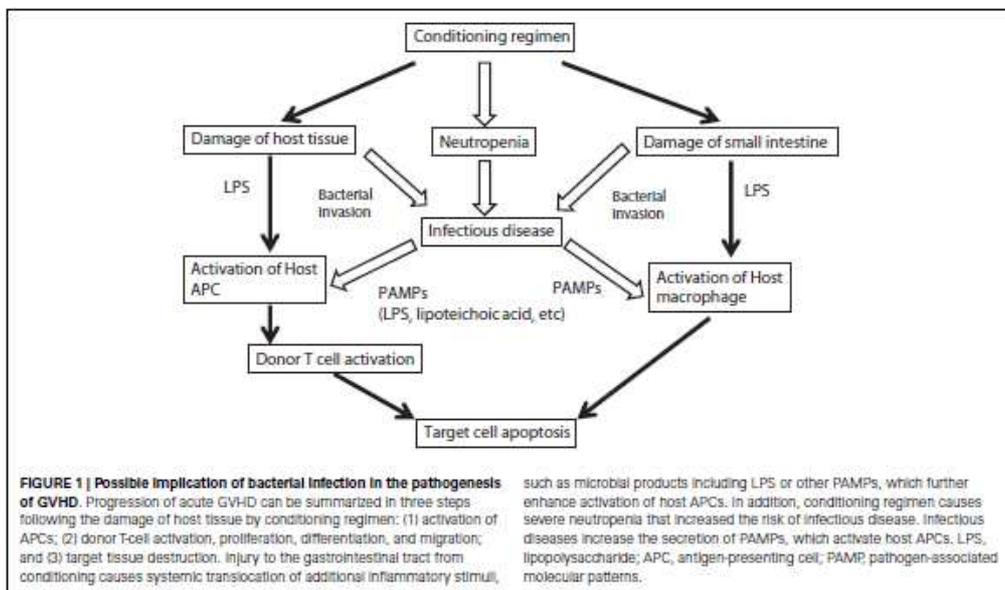


Figura. Implicaciones de las infecciones bacterianas en la patogénesis de la EICR.

Fuente: Fuji et al, Front. Oncol 2014

4.3.b. Factores predisponentes en la aparición de infecciones

Existen algunos factores, como el uso de PH de sangre de cordón umbilical o familiares haploidénticos que se asocian a un retraso en la reconstitución inmune y presentan, por tanto, un riesgo aumentado de infecciones tanto pre como post-injerto (Saavedra et al, 2002).

En 2015, un estudio en el que se incluyeron pacientes de nuestro centro evaluó la incidencia de infecciones fúngicas y víricas post-TPH de DNE (Parody et al, 2015). Se analizaron 434 pacientes consecutivos entre 1997 y 2009 y se compararon los datos del grupo de receptores de PH de sangre periférica o médula ósea (n= 369) frente a los receptores de sangre de cordón (SCU) (n=65). La IAc de MRI fue del 14% a +100 días en ambos grupos, sin que se evidenciasen tampoco diferencias significativas al año y los 5 años de seguimiento. Veinte pacientes (31%) en el grupo de SCU desarrollaron una o más IFIs durante el seguimiento, mientras que la tasa fue del 18% en los receptores de MO o SP (p=0.02). La IAc de aspergilosis invasiva fue significativamente mayor en el grupo de SCU tanto a +100 días como al año (16 vs. 6% y 20 vs. 9.7% respectivamente, p=0.04).

Los factores de riesgo asociados al desarrollo de IFI en el análisis multivariado incluyeron: infección previa por CMV, EICRa grado II-IV, EICRc severa y edad > 35 años. Respecto a la infección por CMV, se evidenció una tendencia a la aparición de cifras más altas en receptores de SCU (46% vs. 38% a un año, p= 0.1). Un 36% del total de pacientes presentaron más de un episodio de reactivación.

Treinta y nueve enfermos desarrollaron enfermedad por CMV, en 10 casos sin detección de viremia previa. La IAc de enfermedad por CMV fue del 8% al año del TPH en ambos grupos. Las reactivaciones de VEB y los SLP-PT asociados al virus fueron más frecuentes en los receptores de SCU. Los pacientes alotrasplantados en el periodo más reciente (2003-2009) mostraron una cierta tendencia a una menor MRI a 5 años, menores tasas de enfermedad por CMV y una mejora en la SG.

Otro estudio reciente (Castagnola et al, 2014) analizó la tasa de episodios de bacteriemia e IFI en niños receptores de un alo-TPH en función de diversos factores, como el tipo de donante o la presencia y grado de EICRa. La serie incluía únicamente un 17% de pacientes con EICR refractaria. Un 45% de los niños presentaron al menos un episodio de infección grave, con un 38% sufriendo más de uno. En un 72.4% la causa fue bacteriana, en un 23% se evidenció una IFI y un 4.5% de los episodios tuvieron una etiología mixta. Los cocos grampositivos fueron el agente etiológico más frecuente (n=53). Únicamente el tipo de donante se asoció al desarrollo de infección grave y bacteriemia, con un mayor riesgo para los receptores de trasplante de donante alternativo respecto a los de DE HLA idéntico.

Respecto al riesgo de IFI, el análisis univariado mostró una asociación estadísticamente significativa con el grado de EICRa ($p=0.0002$) que resultó mayor en caso de EICRa severa (HR, 3.26; IC95%, 1.6-5.8). De igual forma, la refractariedad a esteroides se asoció al riesgo de IFI (HR 3, $p= 0.01$) en el análisis univariado. No obstante, el estudio multivariado mostró que el HR se asociaba de forma significativa únicamente al grado de EICRa ($p=0.0002$), siendo el riesgo de IFI 3 veces mayor en los niños con EICR severa. El estudio evidenció a su vez que tanto las bacteriemias como las IFIs pueden ocurrir de forma muy tardía durante el seguimiento de los pacientes trasplantados, especialmente en presencia de EICR.

La mayor parte de estudios realizados en adultos, muestran que tanto la presencia de EICRa, como la dosis total de esteroides administrada, además de la duración de la neutropenia son los principales factores asociados con la aparición de bacteriemia e IFI (Lili et al, 2012; Poutsiaika et al, 2011; Marr et al, 2002).

4.3.c. Infecciones en pacientes con EICR aguda

En los pacientes con EICR que requieren de tratamiento inmunodepresor adicional los déficits inmunitarios son aún más profundos y prolongados. La reconstitución inmune se correlaciona de forma inversa con la severidad de la EICR (Sale et al, 1992) y esta situación empeora de forma marcada con el tratamiento con esteroides, AcMo y otras maniobras inmunodepresoras.

Antes de la introducción del tratamiento “pre-emptive” frente al CMV, la incidencia de viremia tras un alo-TPH se encontraba alrededor del 40-69% en los individuos seropositivos, con presencia de afectación orgánica en un 15-25% de los pacientes. Los principales factores de riesgo para el desarrollo de complicaciones por el virus son el estado serológico pre-PTH del receptor, el desarrollo de EICR y la inmunodepresión asociada (Meyers et al, 1986; Nichols et al, 2002; Ljungman et al, 2006).

Un estudio retrospectivo (Buthani et al, 2015) evaluó la incidencia, factores de riesgo y pronóstico de infección y/o enfermedad por CMV en 252 pacientes con EICRa digestiva. Un 45% de los pacientes presentaron reactivación del virus tras una mediana de 34 días (rango: 14-236) después del TPH. La serología frente a CMV pre-TPH del receptor fue el único factor asociado de forma significativa al posterior desarrollo de viremia. Treinta y un pacientes fueron diagnosticados mediante biopsia de una colitis por CMV. En 29, el diagnóstico se realizó de forma retardada, en una segunda biopsia por persistencia de la clínica digestiva a pesar de la aparente respuesta de la EICR en otros órganos.

La IAc de enteritis por CMV a un año fue del 16.4%. La mediana de días hasta el diagnóstico fue de 52 (rango: 19-236). El grado máximo de afectación por EICR y el desarrollo de enfermedad por CMV fueron los dos únicos factores relacionados con la SG. El desarrollo de viremia sin afectación orgánica no se asoció a un aumento en la mortalidad. Un 29% de los pacientes (n=73) incluidos en la serie recibieron tratamiento de segunda línea frente a la EICR. Entre los fármacos administrados se encontraban: sirolimus (27), etanercept (22), ATG (11), MFM (7), rituximab (4) infliximab y fotoaféresis extracorpórea (1). En este subgrupo de pacientes la tasa de reactivación de CMV fue del 43% y siete (10%) desarrollaron una enteritis por el virus. En los pacientes con respuesta a corticoides (n=179) la incidencia de viremia y enteritis fue del 46% y el 13%, respectivamente (NS). La serología frente al CMV del receptor resultó el factor de riesgo más importante para el desarrollo de infección y enfermedad por CMV. La presencia de EICRa activa y el uso de inmunosupresión fueron otros factores de riesgo importantes. El estudio concluyó que la infección por CMV es un problema importante en pacientes con EICR digestiva que impacta de forma clara en la SG en este contexto.

Una de las propuestas que se extraen del estudio es el potencial interés de identificar grupos de pacientes de alto riesgo en los que aplicar estrategias de profilaxis primaria frente a CMV.

Otro aspecto importante que ha sido tratado por algunos grupos (Sayer et al, 1994) es el impacto de las dosis acumuladas de esteroides en el riesgo de infección en pacientes con EICR. Mielcarek et al. publicaron que una dosis inicial de corticoides baja (1 mg/kg/d) se asociaba a un menor número de IFI que dosis de 2 mg/kg/d. La acumulación de altas dosis de esteroides es particularmente habitual en los pacientes con EICRa severa (grados III-IV) donde el apropiado manejo de las infecciones oportunistas es crucial.

Matsamura-Kimoto et al, publicaron recientemente un estudio retrospectivo incluyendo 91 pacientes tratados con MP por EICR grado III-IV. Trece (14%) precisaron tratamiento de segunda línea con MFM (11), ATG (1) y células mesenquimales (1), respectivamente. La IAc de IFI, infección por CMV, enfermedad por CMV, otras infecciones virales graves (ADV, BK, VHS, VH6, VEB o VVZ) y bacteriemia por gramnegativos a los 6 meses de iniciado el tratamiento esteroideo fue del 14% (IC95% 7-22%), 80% (IC95% 68-88%), 21% (IC95% 13-30%), 28% (IC95% 7-22%) y 20% (IC95% 13-29%), respectivamente. De los 13 pacientes con IFI un 85% se catalogaron como aspergilosis invasiva probable o probada. La IFI fue considerada la causa principal de exitus en 2 de los 13 casos (15%). De los 19 pacientes que desarrollaron enfermedad por CMV, el órgano afecto fue el colon en todos los casos. En ningún paciente el CMV se consideró responsable de la muerte. De los 29 enfermos con infecciones víricas de otro tipo, 26 (90%) presentaron una cistitis hemorrágica por ADV o poliomavirus

BK, dos encefalitis por virus herpes 6 (VH6) y uno una meningitis por virus varicela-zóster (VVZ). Dos pacientes (7%) murieron por dicha infección (una infección sistémica por adenovirus y una encefalitis por VH-6). Cuatro de los 22 pacientes con infección por bacterias gramnegativas murieron por dicho cuadro (18%). El análisis univariado mostró que la disparidad HLA se asoció a un aumento del riesgo de infección por CMV y que el desarrollo precoz de EICR (antes de 26 días post-TPH) aumentó el riesgo de enfermedad por CMV y otras infecciones víricas. La linfopenia grave (<550/ul) al inicio del tratamiento corticoideo se asoció a un riesgo incrementado de enfermedad por CMV y bacteriemia. La necesidad de tratamiento de rescate frente a la EICR incrementó el riesgo de IFI, pero no el de otros tipos de infección. El análisis multivariado no logró detectar factores independientes relacionados con el riesgo de infección. Aparentemente, el riesgo tampoco fue diferente entre respondedores a esteroides y no respondedores. Dosis acumuladas de esteroides mayores o iguales a 55 mg/d durante las primeras 4 semanas post-TPH se asociaron a un mayor riesgo de IFI (HR 3.65; IC95% 1.17-11.4, p=.03) y dosis totales mayores o iguales a 23 mg/kg aumentaron el riesgo de otras infecciones víricas (HR 4.14; IC95% 1.25-13.7, p=0.03).

El estudio destaca la elevada incidencia de infecciones oportunistas en pacientes que reciben corticoides por una EICR severa respecto a la que presentan pacientes alotrasplantados sin dicha complicación (6.6% IFI, 8.3% enfermedad por CMV, 9.8% otras infecciones virales, 9.7% gérmenes gramnegativos).

La linfopenia y la hipogammaglobulinemia pueden resultar críticas para el desarrollo de infecciones víricas, mientras la neutropenia tiene un papel fundamental en el inicio de IFIs. Se necesitan dosis mayores de esteroides para inhibir la función de los neutrófilos respecto a las que alteran la función linfocitaria; esto explicaría los diferentes rangos necesarios para incrementar cada uno de estos subtipos de infección.

4.3.d. Infecciones en pacientes con EICRa refractaria a esteroides

La mayor parte de los estudios que han evaluado el tratamiento de rescate en pacientes con EICR moderada y grave refractaria muestran una SG muy baja a largo plazo, fundamentalmente asociada a una alta tasa de infecciones oportunistas debida a la gran inmunodepresión y/o al daño orgánico progresivo y directo de la EICR.

Un trabajo reciente (Han Park et al, 2013) que ha evaluado la eficacia del etanercept en una serie de 18 pacientes con EICR refractaria mostró que sólo 10 de ellos recibieron una dosis total mínima de 100 mg del AcMo. En cinco de los 8 casos que recibieron dosis menores, el factor limitante para su administración fue la presencia de infecciones graves intercurrentes.

La mayor parte de pacientes fallecieron por progresión de la EICR asociada a complicaciones infecciosas. Tres individuos desarrollaron una IFI (2 candidiasis y una aspergilosis invasiva), que fue la causa principal del fallecimiento en uno de los pacientes. Las infecciones fueron la segunda causa de muerte tras la EICR y las de etiología fúngica comportaron un 25% de las infecciones fatales. La MRI en este estudio fue del 22.2% (4/18).

Otros estudios en que se utilizaba etanercept asociado a un segundo inmunodepresor como tratamiento de rescate mostraron tasas de MRI todavía más elevadas, que oscilaron entre el 30 y el 52%. Por ejemplo, Wolf et al, publicaron en el 2005 una serie de 21 pacientes con EICR tratados con la combinación etanercept-daclizumab. Cabe destacar que en este estudio, la profilaxis/tratamiento antifúngica incluyó en todos los casos fármacos con eficacia anti-*Aspergillus* (itraconazol, amfotericina B o voriconazol). Cuatro pacientes desarrollaron sepsis bacterianas, que fueron fatales en 2 de los casos. Se evidenciaron 11 casos de IFI (52%): dos pacientes que presentaban una aspergilosis invasiva al inicio del tratamiento de rescate murieron precozmente (días +5 y +8 tras el inicio de la segunda línea) por progresión de la IFI. Otros dos desarrollaron la infección durante el tratamiento y murieron por progresión de la misma y no respuesta de la EICR, respectivamente. Se observaron 4 casos más de IFI, en este caso tardías, en pacientes con EICR crónica o recaída de la enfermedad de base. Hubieron también 3 casos de candidiasis sistémica intra-tratamiento. Trece pacientes (62%) presentaron una infección por CMV durante el seguimiento y precisaron tratamiento “pre-emptive” con ganciclovir. Dos casos (9.5%) desarrollaron una cistitis hemorrágica por BK. Un 43% de los pacientes (9/21) murió por infecciones oportunistas, 4 de ellos de forma tardía en asociación a EICR crónica.

Cifras similares de infección oportunista y MRI las publicaron Monllee et al. en 2001. Su serie incluía 20 pacientes en los que se administró como tratamiento de rescate tacrolimus y ATG (15mg/kg/5 días). Un 80% de los individuos presentó infecciones oportunistas en las 6 semanas posteriores al inicio del rescate, en su mayor parte de etiología polimicrobiana (12 bacterianas, 8 víricas, 4 fúngicas, 3 sin aislamiento definitivo). Cinco pacientes (25%) fallecieron a causa de una infección grave.

Muy recientemente, van Groningen et al. han publicado una serie de 21 pacientes con EICR refractaria tratados con la combinación inolimomab-etanercept. La respuesta global al tratamiento en el día +28 fue del 48%, pero 19 pacientes fallecieron en los 6 meses posteriores, fundamentalmente por progresión de la EICR e infecciones asociadas. Trece pacientes (62%) presentaron al menos un episodio infeccioso tras el tratamiento de segunda línea. Las bacteriemias fueron las infecciones más frecuentes (33%), fundamentalmente por enterococo y estafilococo aureus. Dos pacientes (9.5%) desarrollaron una IFI probable.

Se evidenciaron 3 casos de infección por VEB (14.3%) que se resolvieron mediante tratamiento con rituximab, sin ninguna progresión a SLP-PT. Los autores destacan que dichas infecciones condicionaron la suspensión precoz del tratamiento inmunosupresor en un número elevado de casos.

4.3.e. Mejoras en el manejo de las infecciones post-TPH y justificación del Manuscrito número 3

Teniendo en cuenta los datos de los estudios previamente referenciados, una de las principales ideas que se extraen es que, en este grupo de pacientes de tan alto riesgo, el principal factor condicionante del elevado número de infecciones oportunistas es la EICR refractaria “*per se*” y no tanto el protocolo de tratamiento inmunodepresor utilizado. Probablemente sean las diferentes estrategias de profilaxis antimicrobiana y monitorización de infecciones que se han aplicado las que explican gran parte de las diferencias en la incidencia de infección y supervivencia entre los distintos grupos a largo plazo y que su optimización permita reducir la MRT. Por tanto, uno de los aspectos que ayudaría a avanzar en este ámbito consiste en ampliar el conocimiento sobre la incidencia y características de las principales infecciones oportunistas detectadas, para posteriormente identificar las mejores estrategias de profilaxis antimicrobiana y/o terapia celular adoptiva con las que disminuir su riesgo de aparición. Es éste el objetivo principal del tercer manuscrito incluido en esta tesis doctoral, que describe la incidencia, etiología e impacto de las infecciones oportunistas en una serie amplia de pacientes afectados por una EICRa refractaria moderada y/o grave.

5. Hipótesis y objetivos específicos de los estudios

Manuscrito 1: Evaluación del impacto de los niveles de Ciclosporina A en el desarrollo de EICRa tras el trasplante alogénico de intensidad reducida.

La hipótesis planteada en el primer artículo de la presente tesis doctoral se basa en el impacto de los niveles de inmunodepresión durante el periodo post-TPH inicial tanto en el desarrollo de EICR aguda como en los resultados globales del procedimiento.

Los objetivos específicos fueron:

1. Análisis del efecto de la concentración sanguínea de CsA en el desarrollo posterior de EICR aguda grado 2-4.
2. MRT y SG a los 180 días y al año del TPH.
3. Análisis uni y multivariado de los factores con impacto en los resultados globales mencionados en el punto previo (MRT y SG), previa selección de una serie de variables relacionadas con el paciente y/o el trasplante, incluida la concentración de CsA en plasma durante las 4 primeras semanas post-TPH.
4. Evaluación de la toxicidad secundaria a la CsA durante el periodo post-TPH precoz, especialmente la relación entre los niveles sanguíneos del fármaco y la aparición de insuficiencia renal aguda.

Manuscrito 2: Actualización en la experiencia de uso de inolimomab como tratamiento de la EICR aguda refractaria a esteroides.

Los orígenes del segundo artículo de este trabajo doctoral parten de la publicación de la revisión crítica de Martin et al. en BBMT en el 2012. En ella, se analizaban en detalle las limitaciones más importantes y frecuentes de los estudios que evaluaron las estrategias de rescate frente a la EICR refractaria y se proponían mecanismos para mejorar la calidad y rigurosidad de futuros análisis.

Teniendo en cuenta que en el 2006 nuestro grupo publicó resultados muy esperanzadores con el uso de inolimomab en pacientes con EICRa en fase avanzada, en este nuevo trabajo nos propusimos confirmar dichos resultados al ampliar el número de pacientes incluidos y su periodo de seguimiento y al aplicar de la forma más rigurosa posible los criterios de calidad recientemente recomendados.

Los objetivos específicos del trabajo fueron:

1. Evaluación de la respuesta global de la EICRa a inolimomab a +15, +30 y +60 días desde su inicio.
2. Análisis uni y multivariado de los factores predictores de respuesta al fármaco en el día +30.
3. SG a los 6, 12 y 24 meses del tratamiento de rescate y diferencias entre los pacientes con respuesta al inolimomab y los no respondedores (para ello se realizó un “landmark analysis” donde sólo se incluyeron los pacientes vivos en el día + 30 post-tratamiento).
4. Descripción de las causas principales de muerte tras el desarrollo de EICR refractaria.

Manuscrito 3: Patrones de infección y mortalidad de causa infecciosa en la EICR aguda refractaria a esteroides.

El tercer trabajo que conforma esta tesis se ideó con el objetivo de estudiar en profundidad el impacto de las infecciones oportunistas en la morbi-mortalidad de los pacientes con EICR córtico-refractaria. Su punto de partida fue los hallazgos del segundo estudio de esta tesis que analizó el papel de inolimomab como tratamiento de rescate frente a la EICR. Dicho estudio reveló una tasa muy elevada de infecciones oportunistas, con un 58% de los pacientes con al menos una infección grave y un 27% de muertes directamente relacionadas con la infección. Estos datos, sumados a la ausencia de bibliografía específica sobre el tema con la que comparar nuestros resultados dieron pie al diseño de un nuevo proyecto.

En este caso, pretendíamos analizar la frecuencia de los diferentes tipos de infecciones graves y gérmenes responsables, los factores de riesgo asociados a la mortalidad por infección y su impacto en los resultados globales del TPH en pacientes con EICR refractaria. Para ello, se amplió y actualizó la serie de pacientes tratados con inolimomab, en la que se incluyó además todos los casos de EICRa resistente diagnosticados a partir del 2012, momento en que el tratamiento de rescate se sustituyó por etanercept. Los objetivos concretos del trabajo fueron:

1. Descripción de la incidencia de infección grave, incluyendo casos de infección bacteriana, fúngica invasiva, vírica y sus agentes responsables.
2. Estudio de la incidencia acumulada de fallecimientos relacionados con infección.
3. Análisis uni y multivariado de los factores predictores de mortalidad infecciosa.

6. Resultados

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

Artículo 1: García-Cadenas I, Valcárcel D, Martino R, et al. Impact of Cyclosporine levels on the development of acute Graft Versus Host Disease after HLA identical sibling reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Mediators of Inflammation*. 2014; 2014: 620682: 1-7.

Artículo 2: García-Cadenas I, Valcárcel D, Martino R, et al. Updated Experience with Inolimomab as treatment for Corticosteroid-Refractory Acute Graft versus Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 Mar;19 (3):435-9.

Artículo 3: García-Cadenas I, Rivera I, Martino R, et al. Patterns of infection and infectious-related mortality in patients with steroid-refractory acute Graft versus Host Disease. *Bone Marrow Transplant*. 2017 Jan;52(1):107-113.

6.1. Evaluación del impacto de los niveles de Ciclosporina A en el desarrollo de EICR tras el trasplante alogénico de intensidad reducida.

6.1.a. Diseño del estudio:

Se incluyeron 156 pacientes con hemopatías malignas que recibieron un alo-TIR de hermano HLA idéntico en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau entre abril de 1999 y enero del 2010. Los criterios de inclusión fueron tener una hemopatía maligna que requiriese un alo-TPH, no ser candidato a acondicionamiento mieloablativo por la presencia de comorbilidades, edad avanzada y/o múltiples líneas de tratamiento previas, que la fuente de PH utilizada fuese sangre periférica movilizada con GCSF y el donante un hermano HLA idéntico. El uso de depleción T ex-vivo o in-vivo se consideró un criterio de exclusión para el estudio.

Todos los pacientes recibieron esquemas de acondicionamiento basados en Fludarabina 150 mg/m² o su equivalencia vía oral (200 mg/m²) en combinación con Busulfan oral (8-10 mg/kg) en caso de hemopatía mieloide o Melfalan (70-140 mg/m²) si patología linfoide. Como profilaxis frente a la EICR se administró CsA asociada a metotrexato (MTX) o MFM. La CsA se inició el día -7 en la mayor parte de los pacientes, a una dosis inicial de 1.5 mg/kg/12h y en perfusión de 2 horas.

La concentración basal de CsA en sangre se determinó mediante radio-inmunoanálisis un mínimo de 2 veces por semana durante todo el post-TPH precoz. Sus niveles se ajustaron de forma dinámica, en función del valor obtenido y el filtrado glomerular, para mantener el fármaco en un rango terapéutico de entre 200-300 ng/ml.

Como consideraciones estadísticas, cabe detallar que para el cálculo de la concentración media de CsA en sangre de cada uno de los pacientes se utilizaron los valores de las diferentes analíticas extraídas cada una de las semanas. Las medias de CsA en las diferentes semanas se compararon mediante el test de ANOVA. El impacto de los niveles de CsA en los resultados del TPH a largo plazo se analizó como covariable tiempo-dependiente considerando como “evento” el día de desarrollo de EICR.

6.1.b. Resultados:

Características de la población

La edad mediana de los pacientes fue de 52 años (rango: 17-69). En un 35% la indicación de TPH fue una hemopatía maligna mieloide y en un 65% linfoide.

Un 54% presentó la enfermedad de base en fase avanzada en el momento del TPH y un 17% tuvo algún grado de deterioro en la función renal previo al ingreso. La profilaxis con CsA se combinó con MTX en 121 casos (77.6%) y MFM en el resto.

Niveles de CsA durante el post-TPH precoz

La concentración media de CsA fue significativamente menor durante la primera semana post-TPH que en las 3 posteriores, con valores de 134 (10-444), 219 (54-656), 253 (53-910) y 224 (30-699) ng/ml respectivamente ($p < 0.0001$). Un elevado número de pacientes presentaba niveles infraterapéuticos (< 150 ng/ml) del fármaco durante dichas semanas con sólo un 15% de pacientes dentro del rango terapéutico deseado los primeros 7 días post-TPH y entorno al 45% en las 3 semanas posteriores. No se evidenciaron diferencias significativas en los niveles de CsA de la primera semana en función del inicio del fármaco en el día -7 o el -1.

Incidencia de EICR aguda y factores asociados a su aparición

Ochenta y siete pacientes (56%) desarrollaron EICRa, que en 55 casos se catalogó como moderada o severa (36%), con unas IAc de EICR global y grado 2-4 del 58% (IC 95%: 50-64%) y 45% (IC 95%: 34-50%), respectivamente. La concentración media de CsA en sangre en la segunda y tercera semana post-TPH fueron inferiores en los pacientes que desarrollaron EICRa 2-4 (201 vs. 237 ng/ml, $p = 0.01$ y 248 vs. 283 ng/ml, $p = 0.06$). En el análisis univariado, los factores asociados con la aparición de esta complicación fueron la disparidad de sexo en dirección donante mujer/receptor hombre frente al resto de combinaciones y la concentración media de CsA por debajo de 150 ng/ml en la segunda y tercera semanas post-TPH. El análisis multivariado mostró la disparidad de sexo y los niveles bajos de CsA en sangre durante la tercera semana post-TPH como únicas variables con asociación significativa al desarrollo posterior de EICRa moderada y severa.

Toxicidad asociada a CsA

Un 31% de los pacientes desarrolló toxicidad renal durante las primeras 5 semanas post-TPH. La CsA se consideró la única causa responsable de su aparición en un 71% de los casos. Seis pacientes (3.8%) presentaron una MAT. No se evidenciaron diferencias significativas en la concentración media de CsA de la semana previa entre los pacientes con MAT o deterioro renal

atribuido al fármaco respecto al resto (244 vs. 211 ng/ml; P=0.2). Tampoco se detectaron diferencias en las concentraciones de CsA del primer mes en los pacientes con nefrotoxicidad respecto a aquellos sin alteraciones renales (205ng/ml vs. 208ng/ml; P=0.4) ni en la incidencia de EICRa entre pacientes con y sin toxicidad renal (P=0.4).

Mortalidad asociada al TPH y Supervivencia

Las IAc de MRT a los 6 meses y al año fueron del 15% (IC95%: 11-22) y el 20% (IC95%: 15-28), respectivamente. Los factores asociados a una mayor MRT en el análisis univariado fueron la disparidad de sexo, la fase avanzada de la enfermedad al TPH, los niveles bajos de CsA en la tercera semana, el desarrollo de insuficiencia renal y la aparición de EICRa 2-4. En el análisis multivariado sólo mantuvieron la significación estadística el estado avanzado de la enfermedad al TPH (HR 2.2, P=0.01) y el desarrollo de EICRa 2-4 (HR 2.5; P= 0.01). Los niveles bajos de CsA en la tercera semana mostraron una tendencia a mayor riesgo de TRM sin alcanzar la significación estadística (P=0.06).

Las probabilidades de SG al año y los 5 años fueron del 67% (IC95% 59-74.5%) y el 45% (IC95% 33-51%), respectivamente. La recidiva de la enfermedad de base fue la causa principal de muerte (39%), seguida por la EICR aguda (16%) y crónica (11.5%). En 16 casos la causa muerte se atribuyó a una infección (18%). Las dos únicas variables asociadas a una peor SG en el análisis multivariado fueron la fase avanzada de la enfermedad al TPH (HR 2.2; P=0.02) y el desarrollo de EICRa grado 2-4 (HR 2.5; P<0.01).

Los resultados de esta parte del trabajo fueron publicados en forma de artículo en la revista “Mediators of Inflammation”. A continuación se aporta una copia del trabajo tal y como fue publicado.

Clinical Study

Impact of Cyclosporine Levels on the Development of Acute Graft versus Host Disease after Reduced Intensity Conditioning Allogeneic Stem Cell Transplantation

Irene García Cadenas,¹ David Valcarcel,^{1,2} Rodrigo Martino,¹ J. L. Piñana,^{1,3} Pere Barba,^{1,2} Silvana Novelli,¹ Albert Esquirol,¹ Ana Garrido,¹ Silvana Saavedra,¹ Miquel Granell,¹ Carol Moreno,¹ Javier Briones,¹ Salut Brunet,¹ and Jorge Sierra¹

¹ Hematology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Banc de Sang i Teixits, Institut Josep Carreras, Mas Casanovas 90, 08025 Barcelona, Spain

² Hematology Department, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

³ Hematology Department, Hospital Clínic de Valencia, Valencia, Spain

Correspondence should be addressed to Irene García Cadenas; igarcia@sanpau.cat

Received 17 August 2013; Accepted 22 December 2013; Published 30 January 2014

Academic Editor: Mohamad Mohty

Copyright © 2014 Irene García Cadenas et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

We analyze the impact of cyclosporine (CsA) levels in the development of acute graft-versus-host disease (aGVHD) after reduced intensity conditioning allogeneic hematopoietic transplantation (allo-RIC). We retrospectively evaluated 156 consecutive patients who underwent HLA-identical sibling allo-RIC at our institution. CsA median blood levels in the 1st, 2nd, 3rd and 4th weeks after allo-RIC were 134 (range: 10–444), 219 (54–656), 253 (53–910) and 224 (30–699) ng/mL; 60%, 16%, 11% and 17% of the patients had median CsA blood levels below 150 ng/mL during these weeks. 53 patients developed grade 2–4 aGVHD for a cumulative incidence of 45% (95% CI 34–50%) at a median of 42 days. Low CsA levels on the 3rd week and sex-mismatch were associated with the development of GVHD. Risk factors for 1-year NRM and OS were advanced disease status (HR: 2.2, $P = 0.02$) and development of grade 2–4 aGVHD (HR: 2.5, $P < 0.01$), while there was a trend for higher NRM in patients with a low median CsA concentration on the 3rd week ($P = 0.06$). These results emphasize the relevance of sustaining adequate levels of blood CsA by close monitoring and dose adjustments, particularly when engraftment becomes evident. CsA adequate management will impact on long-term outcomes in the allo-RIC setting.

1. Introduction

Myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation is the standard of care therapy for patients with several hematologic malignancies, but its high treatment-related mortality (TRM) frequently counterbalances its beneficial effects. Currently, reduced intensity conditioning (RIC) allows allogeneic transplantation in patients otherwise considered ineligible because of advanced age or associated comorbidities. Although early TRM is reduced with RIC regimens, the development of graft-versus-host disease (GVHD) remains an important cause of transplant related morbidity and mortality [1–3].

Posttransplantation administration of immunosuppressive agents remains the most widely used strategy to prevent GVHD. A calcineurin inhibitor, mainly Cyclosporine-A (CsA) in combination with a second drug, remains the most common approach to prevent the occurrence of GVHD [4].

Several studies on myeloablative conditioning allogeneic transplantation have shown that low whole blood concentrations of CsA during the periengraftment period can strongly affect the incidence of grade 2–4 acute GVHD (aGVHD) [5, 6]. The impact of CsA levels in allo-RIC setting has been less studied and justified the investigation reported here. Accordingly, this study evaluated the impact of CsA levels on the development of moderate to severe aGVHD, TRM,

and overall survival (OS) in a cohort of consecutive HLA-identical sibling allo-RIC recipients.

2. Patients and Methods

2.1. Patients. We analyzed the data of 156 consecutive adult patients included in two prospective allo-RIC cohorts from our center transplanted between April 1999 and January 2010. All patients were diagnosed with hematological malignancies and received granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF-) mobilized peripheral blood stem cells from HLA-identical siblings without *in vivo/ex vivo* T-cell depletion. HLA matching was performed by low resolution techniques for HLA A and HLA B and at the allelic level for HLA-DRB1 [7]. All participants gave written informed consent and the studies were approved by the national and local ethics committees.

2.2. Transplant Conditioning and GVHD Prophylaxis. The conditioning regimen consisted of intravenous fludarabine 150 mg/m² or its equivalent oral doses (200 mg/m²) combined with either targeted doses of oral busulfan 10 mg/kg (8 mg/kg for patients >65 years) for myeloid malignancies or melphalan 140 mg/m² (70 mg/m² for patients >65 years) for lymphoid malignancies. GVHD prophylaxis administered was CsA plus either mycophenolate mofetil (MMF) or short course methotrexate (MTX). CsA was started on day -7 in most patients and administered at an initial dose of 1.5 mg/kg/12 h as a 2-hour infusion and then adjusted to maintain blood levels of 200–300 ng/mL. CsA was switched to an oral formulation at a ratio of 1:1 when patients were able to tolerate oral intake.

From 1999 to 2003, MTX was administered on days +1, +3, and +6 (10 mg/m²) and folic acid rescue was administered 24 h after each dose (*n* = 121, 78%). In 2004 MTX was substituted for MMF (*n* = 35, 22%) in an effort to reduce MTX-related toxicity. MMF was started on day 0 (at least 10 h after the infusion of progenitors) at a dose of 15 mg/kg/8 h and continued until day +30, when it was tapered in the absence of aGVHD. As we have described previously [8, 9] and confirmed again in our patient population, the use of CsA+MTX versus CsA+MMF or conditioning with busulphan versus melphalan had no impact on the occurrence of grade 2–4 aGVHD; so we analyzed all the patients as a whole group.

2.3. Cyclosporine Dose Adjustment and GVHD Assessment. CsA whole-blood concentration was measured by radioimmunoassay [10] at least twice weekly during the first four weeks after transplantation. Blood samples were collected 12 hours after the prior dose, immediately before the morning dose. According to our current practice, when levels were between 100 and 200 ng/mL the dose was increased by 25%. If CsA concentrations were below 100 ng/mL and there was no renal impairment the dose was increased by 50%. When the blood concentrations were between 301 and 450 or 451 and 600 ng/mL the dose was decreased by 25% and 50%, respectively. If blood concentrations exceeded 601 ng/mL the next dose was omitted and the drug was restarted at half the dose. Renal and liver function and electrolyte concentrations were

monitored daily during admission and at outpatient visits. When kidney impairment occurred (defined as a decrease of >25% of base-line glomerular filtration rate (GFR)) the CsA dose was decreased by 25%. If there were no changes in renal function, the drug was maintained in reduced doses and administered as a 24 h continuous infusion. When severe renal failure occurred (defined as decrease in GFR >50%), CsA was stopped until the renal function recovered, irrespective of the CsA blood levels.

CsA was also discontinued in case of severe thrombotic microangiopathy, defined as the presence of 2 or more schistocytes per high power field on peripheral smear with concurrent increased serum lactate dehydrogenase and renal or neurological dysfunction without other explanations or positive direct Coombs' test result.

Whenever CsA was stopped due to any severe complication, steroids were introduced at a dose of 2 mg/kg/day of prednisone. The dose of steroids was maintained or slowly tapered until the complications resolved or markedly improved; CsA was then restarted at a lower dose, or another immunosuppressive drug was initiated if CsA could not be reintroduced (MMF in most cases).

Diagnosis of aGVHD was based on clinical findings and confirmed with histological evaluation of affected organ(s). The overall grading followed the Przepiora standard criteria [11]. Anti-infectious prophylaxis was performed with acyclovir, quinolones (norfloxacin or ciprofloxacin), and fluconazole. Trimethoprim-sulfamethoxazole or nebulized pentamidine were also used as prophylaxis for at least six months. G-CSF was not routinely administered. Serial serum monitoring of *Aspergillus galactomannan* was performed in all patients since 2004 [12]. A preemptive strategy against cytomegalovirus guided by antigenemia or PCR was performed, as described elsewhere in details [13].

2.4. Risk Assessment. Advanced disease status was defined as acute leukemia in ≥ 2 nd complete response (CR), myeloproliferative disease in accelerated/blast phase or ≥ 2 nd CR, Hodgkin's disease and follicular lymphoma in ≥ 3 rd CR, and large B-cell lymphoma or multiple myeloma in ≥ 2 nd CR. Patients with partial response (PR) or persistent disease at transplantation (except for MM) were also considered as advanced disease status.

2.5. Statistical Considerations. The primary endpoint of the study was to assess the effect of Cyclosporine concentrations on the development of 2–4 aGVHD. The median concentration of CsA blood levels during a given week was calculated for each patient using the different concentrations obtained during that week, as previously reported [5, 14]. The median CsA in different weeks was compared with the ANOVA tests. The impact of CsA levels on posttransplant outcomes was calculated treating this variable as a time-dependent covariate with the event occurring at the onset of aGVHD. Overall survival (OS) and the cumulative incidence of nonrelapse mortality were secondary endpoints.

Univariate analyses of the association of various clinical risk factors with posttransplantation outcomes were calculated using univariate Cox regression models, whereas the

log-rank test was used for OS. Multivariate analyses were performed by Cox proportional hazards regression, and variables with a P value < 0.1 in the univariate testing were included. P values < 0.05 were considered statistically significant, and the hazard ratios (HRs) and their 95% confidence intervals (95% CIs) were calculated. The assumption of proportional hazards over time was tested for all explanatory covariates by using a time-dependent covariate and the analysis of aGVHD and NRM were calculated taking into account relapse as a competing event [15–17]. Survival was estimated by the Kaplan-Meier method, and comparisons of actuarial curves were made with the log-rank test. All statistical analyses were performed using SPSS version 19.0 with the exception of the cumulative incidence analyses which were performed with NCSS 2004 (Number Cruncher Statistical System, Kaysville, UT).

3. Results

3.1. Patient and Transplant Characteristics. Characteristics of the patients are shown in detail on Table 1. The main reasons for receiving RIC instead of myeloablative conditioning were age > 55 years ($n = 77$, 49%), multiple prior therapy lines or autologous HCT ($n = 24$, 15%), and significant medical comorbidities ($n = 10$, 6%). Forty-five patients (29%) presented more than one of the previous circumstances. Fifty-three patients with a myeloid malignancy (35%) received fludarabine-busulfan conditioning, while the 103 patients (65%) with lymphoid malignancies received fludarabine-melphalan. The median follow-up of survivors was 67 (5–121) months.

3.2. Cyclosporine Levels. Table 2 shows in details the results of the CsA levels during the first 4 weeks after allo-RIC. The median blood concentration of CsA in the 1st week after transplantation was lower than in the 2nd, 3rd, and 4th weeks, with values of 134 (range: 10–444), 219 (range: 54–656), 253 (range: 53–910), and 224 (range: 30–699) ng/mL, respectively ($P < 0.001$). Eighty-nine (60%), 24 (16%), 16 (11%), and 21 (17%) patients had median CsA levels below 150 ng/mL during these weeks. Only 15% of patients had CsA levels within the “optimal” range of 200–300 ng/mL in the first week, while around 45% of the cases had a median level within this optimal range from the 2nd to the 4th week after transplantation.

In our series 77 patients began CsA on day -7 . We did not find significant differences in CsA levels during the first week between this group and those who started CsA in day -1 , but the number of patients is small, and these results would need a proper study.

3.3. Incidence and Risk Factors for Acute Graft versus Host Disease. 55 patients (36%) developed 2–4 aGVHD for a cumulative incidence of 45% (34–50%) at day +180. aGVHD appeared at a median time of 42 (range: 16–185) days after allo-RIC. Further details of aGVHD are shown in Table 3. The median CsA blood concentrations in the second and third weeks after transplantation were lower in patients who developed grade 2–4 aGVHD than in the remainder (201 versus

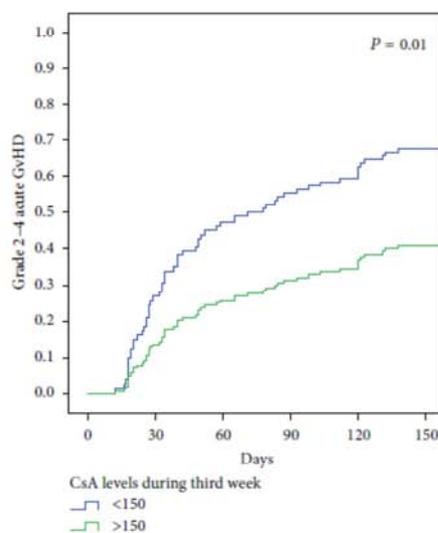


FIGURE 1: Cumulative incidence of grades 2–4 aGVHD. Cumulative incidence of grades 2–4 aGVHD depending on CsA concentration during the third week posttransplantation. The patients with median CsA levels lower than 150 ng/mL are included in the group “Low CsA levels.” CsA: cyclosporine; aGVHD: acute graft versus host disease.

237 ng/mL, $P = 0.01$, and 248 versus 283 ng/mL, $P = 0.06$ shown in Figure 1); in contrast, there were no significant differences in the levels when analyzed on the first (143 versus 139, $P = 0.7$) and fourth weeks (226 versus 254, $P = 0.2$). In univariate analysis the variables associated with a higher incidence of grade 2–4 aGVHD were sex-mismatch (female donor to male recipient versus other combinations ($P < 0.01$)) and low median CsA blood levels (defined as median CsA levels below 150 ng/mL) in the second ($P = 0.02$) and third ($P = 0.01$) weeks after allo-RIC. CMV status, disease phase at SCT, age of the recipient, donor age, conditioning (busulphan versus melphalan), GVHD prophylaxis with MMF versus MTX, and CsA levels in the first and fourth weeks after transplantation were not associated with aGVHD (detailed in Table 4). In multivariate analysis the only significant variables associated with grade 2–4 aGVHD were low CsA concentration during the third week after transplantation and female-to-male sex-mismatch, as shown in Table 4.

3.4. Toxicity and Early Discontinuation of Cyclosporine. Renal impairment occurred in 49 patients (31%) during the first 5 weeks after transplantation. CsA was the only cause of renal failure in 35 of these patients (71%). Six patients (3.8%) developed a thrombotic microangiopathy (TMA). The median concentration in the 7 days before the onset of renal failure or TMA did not differ in patients with CsA-related toxicity or those with other causes of renal dysfunction (244 versus 211, resp.; $P = 0.2$). The median CsA during the first month in patients without renal impairment was 205 ng/mL (range

TABLE 1: Patients' characteristics.

Characteristics	Population (n = 156)
Median age, years (range)	52 (17–69)
Patient sex, n (%)	
Female	64 (41%)
Sex-mismatch, n (%)	
Female to male	41 (26.3%)
Diagnosis, n (%)	
AML/MDS	28 (18%)/17 (11%)
ALL	5 (3%)
NHL/CLL	30 (20%)/11 (7%)
HD	23 (15%)
MM	33 (21%)
CML/other CMPN	7 (5%)/2 (1%)
ECOG, n (%)	
0	135 (86.5%)
1	10 (6.4%)
2	11 (7.1%)
Reason for RIC, n (%)	
Advanced age	77 (49.4%)
Multiple prior lines of treatment and/or prior transplantation	24 (15.4%)
Comorbidities and/or ECOG >1	10 (6.4%)
More than one reason	45 (28.8%)
Disease status, n (%)	
Early phase	72 (46%)
Advanced phase	84 (54%)
Renal impairment before SCT, n (%)	
None	129 (83%)
GFR 50–60 mL/min	16 (10%)
GFR 40–50 mL/min	9 (6%)
GFR < 40 mL/min	2 (1.3%)
CMV serostatus (donor and receptor negative), n (%)	10 (6.4%)
Conditioning regimen, n (%)	
Fludarabine-melphalan	103 (65%)
Fludarabine-busulfan	53 (35%)
CD34 ⁺ × 10E6/kg infused, median (range)	6.7 (1.6–15.6)
GVHD prophylaxis, n (%)	
CsA-MTX	121 (77.6%)
CsA-MMF	35 (22.4%)
Follow-up for survivors in months: median (range)	67 (5–121)

Notes: AML: acute myeloid leukemia; MDS: myelodysplastic syndrome; ALL: acute lymphatic leukemia; NHL: non-Hodgkin lymphoma; CLL: chronic lymphoid leukemia; HD: Hodgkin disease; MM: multiple myeloma; CML: chronic myeloid leukemia; CMPN: chronic myeloproliferative neoplasms; GFR: glomerular filtration rate.

TABLE 2: Description of CsA levels during the first four weeks after stem cell transplantation.

CsA blood concentration; median (range) ng/mL	
First week	134 (10–444)
Second week	219 (54–656)
Third week	253 (53–910)
Fourth week	224 (30–699)
Patients with CsA median levels in the optimal range (200–300 ng/mL); n (%)	
First week	22/149 (15%)
Second week	67/153 (44%)
Third week	66/148 (45%)
Fourth week	53/123 (43%)
Patients with one or more CsA blood level(s) below 150 ng/mL; n (%)	
First week	124 (83%)
Second week	51 (33%)
Third week	28 (19%)
Fourth week	26 (21%)
Patients with CsA median levels lower than 150 ng/mL n (%)	
First week	89 (60%)
Second week	24 (16%)
Third week	16 (11%)
Fourth week	21 (17%)

Note: CsA: cyclosporine A.

TABLE 3: Incidence and characteristics of graft versus host disease.

Patients with aGVHD, n (%)	
Grade 1	32 (20.5%)
Grade 2	32 (20.5%)
Grade 3	18 (11.5%)
Grade 4	5 (3.2%)
Incidence of aGVHD, %, (95% CI)	
Any grade	58% (50–64%)
Grade 2–4	45% (34–50%)
Organs involved, n (%)	
Skin	75 (48%)
Gastrointestinal tract	45 (29%)
Liver	45 (29%)
Day onset of aGVHD, median (range)	
Any grade	43 (12–185)
Grades 2–4	42 (16–185)

Note: aGVHD: acute graft versus host disease.

92–457) compared to 208 ng/mL in those patients who presented nephrotoxicity (range: 10–611; $P = 0.4$).

CsA blood concentration was higher than 300 ng/mL in only 9/49 (18%) cases with renal impairment. Interestingly there were not differences in the incidence of aGVHD between patients who developed nephrotoxicity and those without renal impairment ($P = 0.4$).

TABLE 4: Univariate and multivariate analysis for aGVHD.

Variable	Grade 2–4 aGVHD	
	Univariate analysis <i>P</i>	Multivariate analysis HR CI 95% <i>P</i>
Sex-mismatch (female to male)	0.01	2.5 1.5–4.3 0.01
High CsA concentration		
Second week	0.02	
Third week	0.01	0.99 0.98-0.99 0.03
Patient sex (male)	0.01	

The patients with median CsA levels higher than 150 ng/mL are included in the group "high CsA concentration."

Notes: LR: log-rank; HR: hazard ratio; NS: not statistically significant.

CMV status, disease status at SCT, age of the recipient, conditioning regimen, immunosuppressive schedule, and CsA levels during the first and fourth week after transplantation were not associated with acute GVHD in univariate analysis ($P > 0.1$).

TABLE 5: Univariate and multivariate analysis for nonrelapse mortality and overall survival.

Variables	Nonrelapse mortality			Overall survival		
	Univariate analysis <i>P</i> value	Multivariate cox regression HR (95% CI)	<i>P</i>	Univariate analysis <i>P</i> value	Multivariate cox regression HR (95% CI)	<i>P</i> value
Sex-mismatch (female to male)	<0.01		NS	0.02		NS
Advanced disease status	0.01	2.2 (1.3–4.3)	0.01	0.02	2.2 (1.1–4.3)	0.02
Low median CsA levels in 3rd week*	0.04		NS (0.06)	0.08		NS
Renal impairment*	0.06		NS	0.08		NS
Grade 2–4 aGVHD*	<0.01	2.5 (1.5–4.4)	0.01	<0.01	2.5 (1.4–4.4)	<0.01

Note: CsA: cyclosporine A; aGVHD: acute graft versus host disease; HR: hazard ratio; CI: confidence interval.

* Variables analyzed as time-dependent covariates.

3.5. Nonrelapse Mortality and Overall Survival. Table 5 shows the variables identified as risk factors for the 1-year NRM and OS in univariate and multivariate analyses. The cumulative incidence of NRM for the whole group at +180 days and 1 year was 15% (95% CI: 11–22) and 20% (95% CI: 15–28), respectively. In the multivariate analysis the variables found to have a negative impact on NRM were advanced disease status at transplantation (HR 2.2, P : 0.01) and development of grade 2–4 aGVHD (HR: 2.5, P : 0.01), whereas low median CsA blood levels on the third week after transplantation showed a trend as additional independent risk factor for NRM (P : 0.06).

The 1-year and 5-year probability of OS were 67% (95% CI: 59–74.5%) and 45% (95% CI: 33–51%), respectively. Relapse (39%) was the main cause of death, followed by GVHD (aGVHD: 14 (16%), chronic GVHD: 10 (11.5%)), and infectious complications (n = 16, 18%). The median time to death from any cause was 7.8 months (range: 0.2–94 months). In multivariate analysis, the only two variables associated to adverse OS were advanced disease status at SCT (HR: 2.2, P : 0.02) and development of grade 2–4 aGVHD (HR 2.5, P < 0.01).

4. Discussion

The current study found that, despite close surveillance, the median CsA levels were outside the desired range in a proportion of patients during the early posttransplant period. Of

note, low median levels of CsA during the third week post-SCT were associated with a higher risk of grade 2–4 aGVHD and a trend towards increased risk of NRM.

Despite significant improvements in terms of therapeutic drug monitoring in the last years, one of the most important and unexpected finding in the current study was the substantial proportion of patients with low levels of CsA in the first weeks post-SCT. Despite continuous changes in the dose of CsA, approximately 15% of the patients maintained low levels of CsA during the following three weeks.

Possible explanations for these findings could be the use of short perfusion of CsA, compared to the 8 or 24 h continuous infusion administered in other centers, a less stringent monitoring of CsA levels (every other day in Song et al.'s study) [14, 18, 19] or a conservative approach when CsA dose had to be increased in those patients with very low CsA previous concentrations. In our series, there appears to be no benefit in starting CsA on day –7 instead of –1, supporting the results by Lanino et al. [20].

Renal impairment is a well-known potential toxicity of CsA that appears to be dose related and reversible [21, 22]. The 31% rate of renal impairment during the first month post-SCT in this cohort of patients is similar to previous reports [23, 24]. CsA was considered responsible of renal function impairment in 71% of the cases. Surprisingly, there were no differences in the median CsA concentration the week prior to the onset of renal failure compared to the blood levels in patients who maintained a normal kidney function, even in the 71% of patients who were considered to have CsA-related renal failure.

The incidence of grade 2–4 aGVHD in our population (45% (95% CI 34–50%)) was similar to previous studies in the allo-RIC setting [25] and it was statistically significantly higher in patients with low median CsA levels during the third week post-SCT. This finding may be due to the need of having therapeutic levels of CsA especially during the time of lymphohematopoietic recovery, which was around day +15 (range: 10–29) in our series. This finding is similar to a recently published study analyzing the impact of tacrolimus levels after stem cell infusion (OR: 0.76, 95% CI: 0.58–0.98, $P < 0.05$ for those patients with high concentrations of the calcineurin inhibitor in the third week post-SCT) [26]. Other studies have shown the relationship between low CsA concentrations and increased risk of aGVHD, but conflicting findings about the moment in which this association is more important have been reported. A recent publication by Malard et al. [6], analyzing a series of patients receiving both conventional and RIC regimens, found that the CsA blood levels in the first week after graft infusion was the strongest risk factor for severe aGVHD ($P = 0.012$, RR = 0.24).

Although the development of RIC regimens has allowed patients who are ineligible for standard Allo-SCT to potentially benefit from allogeneic therapy, NRM remains a significant obstacle to the success of Allo-RIC. Our study found that advanced disease status at transplantation and development of grade 2–4 aGVHD was strongly related to higher NRM and lower OS. Taken together, the current study suggests that improving CsA monitoring and dose adjustments may lead to a reduction of grade 2–4 aGVHD and even decrease NRM in the RIC setting.

The main limitations of our study include its retrospective nature and the evaluation of median CsA concentrations instead of the area under the curve over time [27, 28], a much more precise monitoring strategy which, however, is difficult to implement in daily clinical practice. In conclusion, the current study suggests that low median CsA concentrations in the early posttransplant period are associated with a higher incidence of grade 2–4 aGVHD in patients receiving an allo-RIC, suggesting that maintaining high CsA blood levels in the absence of organ toxicity may translate into lower risk of grade 2–4 aGVHD and improved long-term outcomes.

Conflict of Interests

None of the coauthors has reported any conflict of interests of any kind with any information contained in the paper.

References

- [1] R. Martino, D. Valcárcel, S. Brunet, A. Sureda, and J. Sierra, "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*, vol. 41, no. 1, pp. 33–38, 2008.
- [2] D. Valcárcel, R. Martino, D. Caballero 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*, vol. 26, no. 4, pp. 577–584, 2008.
- [3] G. K. Melve, E. Ersvs, A. O. Kittang, and O. Bruserud, "The chemokine system in allogeneic stem-cell transplantation: a possible therapeutic target?" *Expert Review of Hematology*, vol. 4, no. 5, pp. 563–576, 2011.
- [4] R. E. Handschumacher, M. W. Harding, J. Rice, R. J. Drugge, and D. W. Speicher, "Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A," *Science*, vol. 226, no. 4674, pp. 544–547, 1984.
- [5] N. Izumi, T. Furukawa, N. Sato et al., "Risk factors for acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: retrospective analysis of 73 patients who received cyclosporin A," *Bone Marrow Transplantation*, vol. 40, no. 9, pp. 875–880, 2007.
- [6] E. Malard, R. M. Szydlo, E. Brissot et al., "Impact of cyclosporine-A concentration on the incidence of severe acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation," *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, vol. 16, no. 1, pp. 28–34, 2010.
- [7] A. Bontadini, "HLA techniques: typing and antibody detection in the laboratory of immunogenetics," *Methods*, vol. 56, no. 4, pp. 471–476, 2012.
- [8] J. Delgado, A. Marco, E. Moreno et al., "Reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation using oral fludarabine as part of the conditioning regimen," *Cytotherapy*, vol. 11, no. 3, pp. 356–361, 2009.
- [9] J. L. Piñana, D. Valcárcel, F. Fernández-Avilés et al., "MTX or mycophenolate mofetil with CsA as GVHD prophylaxis after reduced-intensity conditioning PBSC from HLA-identical siblings," *Bone Marrow Transplantation*, vol. 45, no. 9, pp. 1449–1456, 2010.
- [10] D. J. Andrews and R. Cramb, "Cyclosporin: revisions in monitoring guidelines and review of current analytical methods," *Annals of Clinical Biochemistry*, vol. 39, no. 5, pp. 424–435, 2002.
- [11] D. Przepiórka, D. Weisdorf, P. Martin et al., "1994 consensus conference on acute GVHD grading," *Bone Marrow Transplantation*, vol. 15, no. 6, pp. 825–828, 1995.
- [12] R. Martino and M. Subirá, "Invasive fungal infections in hematology: new trends," *Annals of Hematology*, vol. 81, no. 5, pp. 233–243, 2002.
- [13] J. L. Piñana, R. Martino, P. Barba et al., "Cytomegalovirus infection and disease after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation: single-centre experience," *Bone Marrow Transplantation*, vol. 45, no. 3, pp. 534–542, 2010.
- [14] Y. Kanda, R. Hyo, T. Yamashita et al., "Effect of blood cyclosporine concentration on the outcome of hematopoietic stem cell transplantation from an HLA-matched sibling donor," *American Journal of Hematology*, vol. 81, no. 11, pp. 838–844, 2006.
- [15] J. P. Klein, J. D. Rizzo, M.-J. Zhang, and N. Keiding, "Statistical methods for the analysis and presentation of the results of bone marrow transplants—part I: unadjusted analysis," *Bone Marrow Transplantation*, vol. 28, no. 10, pp. 909–915, 2001.
- [16] J. P. Klein, J. D. Rizzo, M.-J. Zhang, and N. Keiding, "Statistical methods for the analysis and presentation of the results of bone marrow transplants—part 2: regression modeling," *Bone Marrow Transplantation*, vol. 28, no. 11, pp. 1001–1011, 2001.
- [17] E. L. Kaplan and P. Meier, "Nonparametric estimation from incomplete observations," *Journal of the American Statistical Association*, vol. 53, no. 282, pp. 457–481, 1958.

- [18] M.-K. Song, J.-S. Chung, Y.-M. Seol et al., "Influence of lactate dehydrogenase and cyclosporine a level on the incidence of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation," *Journal of Korean Medical Science*, vol. 24, no. 4, pp. 555–560, 2009.
- [19] P. Martin, N. Bleyzac, G. Souillet et al., "Relationship between CsA trough blood concentration and severity of acute graft-versus-host disease after paediatric stem cell transplantation from matched-sibling or unrelated donors," *Bone Marrow Transplantation*, vol. 32, no. 8, pp. 777–784, 2003.
- [20] E. Lanino, R. Rondelli, F. Locatelli et al., "Early (day –7) versus conventional (day –1) inception of cyclosporine-A for graft-versus-host disease prophylaxis after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation in children. Long-term results of an AIEOP prospective, randomized study," *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, vol. 15, no. 6, pp. 741–748, 2009.
- [21] J. L. Piñana, D. Valcárcel, R. Martino et al., "Study of kidney function impairment after reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. A single-center experience," *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, vol. 15, no. 1, pp. 21–29, 2009.
- [22] W. M. Bennett and J. P. Pulliam, "Cyclosporine nephrotoxicity," *Annals of Internal Medicine*, vol. 99, no. 6, pp. 851–854, 1983.
- [23] C. R. Parikh, B. M. Sandmaier, R. F. Storb et al., "Acute renal failure after nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation," *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 15, no. 7, pp. 1868–1876, 2004.
- [24] S. Kersting, S. V. Dorp, M. Theobald, and L. F. Verdonck, "Acute renal failure after nonmyeloablative stem cell transplantation in adults," *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, vol. 14, no. 1, pp. 125–131, 2008.
- [25] P. Satwani, L. Harrison, E. Morris, G. del Toro, and M. S. Cairo, "Reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation in adults and children with malignant and nonmalignant diseases: end of the beginning and future challenges," *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, vol. 11, no. 6, pp. 403–422, 2005.
- [26] T. Mori, J. Kato, T. Shimizu et al., "Effect of early posttransplantation tacrolimus concentration on the development of acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors," *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, vol. 18, no. 2, pp. 229–234, 2012.
- [27] M. Jin, W. Seto, T. Taylor, E. F. Saunders, J. Doyle, and L. L. Dupuis, "Determination of initial i.v. CYA dosage to achieve target AUC values in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients," *Bone Marrow Transplantation*, vol. 42, no. 7, pp. 455–459, 2008.
- [28] N. Duncan, J. Arrazi, S. Nagra, M. Cook, A. H. Thomson, and C. Craddock, "Prediction of intravenous cyclosporine area under the concentration-time curve after allogeneic stem cell transplantation," *Therapeutic Drug Monitoring*, vol. 32, no. 3, pp. 353–358, 2010.

6.2. Actualización en la experiencia de uso de inolimomab como tratamiento de la EICR aguda refractaria a esteroides.

6.2. a. Diseño del estudio:

Se incluyeron 92 pacientes adultos con hemopatías malignas que recibieron un alo-TPH en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y desarrollaron EICRa grado II-IV sin respuesta a corticoides entre abril de 1999 y diciembre de 2011.

Los criterios de inclusión fueron: diagnóstico de EICRa grado 2-4 córtico-refractaria tras alo-TPH por una hemopatía maligna y tratamiento de rescate con inolimomab, como segunda línea o en fases posteriores. Se incluyeron pacientes con EICRa clásica y de inicio tardío así como casos de “Overlap Syndrome” con predominio clínico de la afectación aguda. Ningún paciente se excluyó por presentar una infección activa, deterioro marcado del estado general (ECOG) o cualquier otra causa.

El inolimomab se administró como “uso compasivo”, via endovenosa y según el siguiente esquema: 11 mg/d durante 7 días y posteriormente 5.5 mg cada 48 horas hasta completar un total de 5 dosis (ciclo de 21 días). Además de los esteroides, todos los pacientes mantuvieron la profilaxis y/o tratamiento previo recibido frente a la EICR excepto en el caso de la ATG.

El estadiaje de la EICR se realizó semanalmente, y los datos de respuesta se reportaron en los días +7, +15, +30 y +60. Teniendo en cuenta que estudios previos indican que la respuesta en el día +28 es el mejor predictor de MRT en este escenario clínico, se seleccionó la respuesta a día +30 como uno de los principales indicadores del análisis.

6.2. b. Resultados:

Características de la población

La edad mediana fue de 50 años (rango: 17-68) siendo el 71% varones. Un 64% de los pacientes presentaban enfermedad en fase avanzada al TPH y un 90% tenían un EBMT risk score intermedio o alto. La media de seguimiento de los supervivientes fue de 60 meses (rango: 6-145). El diagnóstico de EICRa se realizó a una mediana de 34 días desde el TPH (rango: 5-170). Inolimomab se utilizó como primera línea de rescate en la mitad de los casos. El resto habían recibido previamente MFM (22), ATG (20) y CsA (3). El inicio de inolimomab fue a una mediana de 16 días desde el diagnóstico de EICRa (rango: 2-204). Un 94% de los pacientes presentaban grados III-IV de afectación en ese momento. Un 90% presentaba afectación digestiva, un 86% cutánea y un 70% hepática.

Toxicidad e infecciones

El inolimomab se toleró bien, sin reacciones infusionales. Dos pacientes desarrollaron efectos adversos que se atribuyeron al tratamiento, uno de ellos una elevación de transaminasas que se resolvió tras suspender el fármaco y el otro una erupción cutánea leve que mejoró con tratamiento tópico.

Setenta y dos de los 84 pacientes (91% del total de la serie) en que dispusimos de datos completos sobre infecciones desarrollaron al menos una infección grave durante el seguimiento. En un 58% se diagnosticó una o más reactivaciones de CMV tras una media de 7 días desde el inicio del AcMo (rango: 1-103). Un 22% de los pacientes desarrollaron una IFI (14/20 aspergilosis) y un 63% una o más infecciones bacterianas.

Respuesta al tratamiento de rescate

La respuesta global a +15, +30 y +60 días de iniciado el inolimomab fue del 36% (2% RC), 42% (RC 14%) y 46% (RC 26%) respectivamente. En el grupo de pacientes que recibieron el tratamiento como primera línea de rescate las cifras fueron muy similares, con un 39% (RC 0%), 39% (RC 13%) y 50% (RC 26%) de respuestas en los mismos días de evaluación. Los 10 pacientes sin afectación digestiva mostraron cierta tendencia a la obtención de mejores respuestas con el tratamiento (70% vs. 39% respuestas globales) que no alcanzó la significación estadística ($p=0.06$).

Factores predictores de respuesta a inolimomab

La presencia de EICRa grado global menor a 4 (HR: 1.8, IC95% 1.1-3.2, $p=0.03$), la ausencia de linfopenia severa (HR: 1.9, IC95% 1.1-3.3, $p=0.02$) y el inicio tardío de inolimomab (más de 15 días tras el diagnóstico de EICR) (HR: 1.9, IC95% 1.1-3.4, $p=0.01$) se asociaron de forma estadísticamente significativa con la respuesta al fármaco en el día +30.

Supervivencia Global

La probabilidad de SG en la serie completa a los 6, 12 y 24 meses fue del 34% (IC95, 24-44%), 22% (IC95, 13-31%) y 18% (IC95, 10-26%) respectivamente. La causa más frecuente de muerte fue la EICR, aguda (49%) o crónica (13%), seguida por las infecciones oportunistas (27%). Las recaídas de la enfermedad de base fueron poco frecuentes, representando la causa principal del fallecimiento en sólo un 4% de los pacientes.

Para analizar el impacto de la respuesta a inolimomab en el día +30 en la supervivencia a largo plazo, se realizó un “landmark analysis” incluyendo únicamente a los 58 pacientes vivos a los 30 días del inicio del AcMo (39 respondedores, 19 no respondedores).

La SG a 6 meses y 2 años fue significativamente mejor en los pacientes respondedores respecto a los que no mostraron respuesta alguna al fármaco: 67% vs. 26% y 33% vs. 20% respectivamente ($p=0.03$).

*Los resultados de esta parte del trabajo se publicaron en forma de artículo en la revista **Biology Blood Marrow Transplantation**. A continuación se aporta una copia del trabajo en su forma original. Cabe destacar la tabla final incluida (número 3), dónde se evaluó de forma crítica el cumplimiento de las recomendaciones de Martin et al. publicadas con anterioridad en la misma revista.*

Updated Experience with Inolimomab as Treatment for Corticosteroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease



Irene García-Cadenas¹, David Valcárcel^{1,2,*}, Rodrigo Martino¹,
Jose Luis Piñana^{1,3}, Silvana Novelli¹, Albert Esquirol¹, Ana Garrido¹,
Maria Estela Moreno¹, Miquel Granell¹, Carol Moreno¹, Silvana Saavedra¹,
Javier Briones¹, Salut Brunet¹, Jorge Sierra¹

¹Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

²Hospital Vall d'Hebrón, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

³Hospital de Manises, Valencia, Spain

Article history:

Received 29 August 2012

Accepted 14 November 2012

Key Words:

Acute graft-versus-host disease
Steroid refractory
Anti-interleukin-2R
Inolimomab
Allogeneic stem cell
transplantation

ABSTRACT

Refractory acute graft-versus-host disease (aGVHD) remains an important cause of mortality after allogeneic stem cell transplantation. No standard therapy exists once steroids fail to obtain a good response. In 2006, our group published a series of patients who received inolimomab, an anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody, as salvage therapy with initial encouraging results. In this update, we analyzed a larger group of patients with prolonged follow-up. Ninety-two consecutive patients were treated with inolimomab at our center between April 1999 and December 2011. Overall response rate was 42% (complete response in 14%) on day +30. Predictors of failure to respond in the multivariate analysis were overall aGVHD grade IV, instauration of inolimomab before day 15 of aGVHD diagnosis, and severe lymphopenia. Patients without gastrointestinal involvement appeared to do better, with a 70% response rate compared with 39% in patients with gastrointestinal involvement ($P = .06$). However, the 2-year overall survival rate was of 18% for the entire cohort (95% confidence interval, 10% to 26%) and 33% for day 30 responders (95% confidence interval, 25% to 40%) and Acute GVHD was the main cause of death (49%) followed by opportunistic infections (27%). Results of this update show that although inolimomab is a well-tolerated drug with a moderate number of short-term responses, it is associated with long-term survival in only one-third of responding patients. These data highlight the need to investigate new rescue treatments with sustained effect and the importance of reporting long-term outcomes in GVHD studies.

© 2013 American Society for Blood and Marrow Transplantation.

INTRODUCTION

Acute graft-versus-host disease (aGVHD) is the most important cause of non-relapse mortality after allogeneic stem cell transplantation. Its incidence varies between 30% and 80% depending on various risk factors (eg, recipient age, gender disparity, cytomegalovirus serostatus, disease status, stem cell source, human leukocyte antigen mismatch, etc.), and its initial therapy consists of systemic corticosteroids (2 mg/kg daily prednisone or equivalent dose of other steroids) [1–3]. Refractoriness to steroids, which occurs in approximately 50% of patients, is associated with a poor prognosis (approximately 5% to 30% of long-term survivors) [3]. Although multiple second-line therapies (antithymocyte globulin, mycophenolate mofetil, sirolimus, photopheresis, etc.) have been used, often with initial encouraging results, none has been established as a good option, and there is no defined standard salvage therapy [3,4]. The development of new strategies for effective intervention before the development of steroid-refractory disease is also under study. A multicenter, randomized, double-blind, phase III trial evaluating the addition of mycophenolate mofetil versus placebo in addition to systemic corticosteroids as initial therapy for aGVHD was closed early for accrual in November 2011 due to lack of benefit [5,6].

New, recently published recommendations [7–9] call for the establishment of a common formal structure in aGVHD studies. Clear definition of inclusion and response criteria (avoiding best response as endpoint), 28-day evaluation of efficacy, considering as failure the use of other salvage treatment(s), and including at least a 6-month overall survival (OS) rate are some of the most important recommendations.

New advances in the understanding of aGVHD immune pathophysiology emphasize the important role that inflammatory interleukins have in the activation and proliferation of effector T cells, making them an interesting target for monoclonal antibodies [10–12]. In June 1999, we began to use inolimomab, a monoclonal antibody directed against the interleukin-2 receptor, for refractory aGVHD, and since 2006 this has been our standard salvage therapy for steroid-refractory aGVHD [13], based on preliminary encouraging results (58% overall responses, 38% complete responses [CRs], and 59% 1-year survival in responding patients).

In this article, we update our results in a larger group of patients with prolonged follow-up. We made an effort to improve the quality of the study by following the recent recommendations [7] considered important in reporting aGVHD studies.

METHODS

This single-center, retrospective study analyzed the outcomes of 92 consecutive adult patients who received inolimomab as salvage treatment for steroid-refractory aGVHD between April 1999 and December 2011. The sole treatment criterion was presence of steroid-refractory grades II to IV aGVHD, including both classical and late-onset forms. Three patients diagnosed with an overlap syndrome who presented predominantly aGVHD

Financial disclosure: See Acknowledgments on page 439.

* Correspondence and reprint requests: Dr David Valcárcel, Department of Hematology, Hospital Vall d'Hebrón, Universitat Autònoma de Barcelona, Psg Vall d'Hebrón 119-129, 8035-Barcelona, Spain.

E-mail address: dvalcarcel.vhebron@me.com (D. Valcárcel).

Table 1
Patient Characteristics

Characteristics	Value n (%)
Median age, yr (range)	50 (17–68)
Gender male	65 (71)
Sex mismatch: female donor to male recipient	25 (27)
Underlying disease	
Acute leukemia	29 (32)
MDS and MPS	29 (32)
Chronic lymphoproliferative diseases	25 (27)
Others	9 (10)
Advanced disease status at HSCT	59 (64)
Recipient and donor CMV negative	7 (8)
Stem cell source	
Peripheral blood	77 (84)
Bone marrow	10 (11)
Cord blood	5 (5.4)
Donor type	
HLA identical sibling	52 (56)
Alternative	40 (44)
EBMT risk index	
Low risk (score 0–1)	9 (10)
Intermediate risk (score 2–3)	38 (41)
High (score 4–6)	45 (49)
Conditioning regimen	
Reduced intensity (fludarabine plus melphalan or busulphan)	65 (71)
High-dose myeloablative	28 (30)
Alemtuzumab or ATG pretransplantation	16 (17)
GVHD prophylaxis	
CsA-based immunosuppression	85 (92)
Tacrolimus plus sirolimus	7 (8)
Inolimomab as first-line salvage therapy	46 (50)
NR to prior salvage therapies	46 (50)
MMF	22 (24)
ATG	20 (22)
CsA	3 (3)
Median time from allo-SCT to aGVHD onset, d (range)	34 (5–170)
Median time from onset of aGVHD to start of inolimomab, d (range)	16 (2–204)
Overall aGVHD grade at start of inolimomab	
II	6 (6.5)
III	48 (52)
IV	38 (41)
Organs involved by aGVHD at the start of inolimomab	
GI tract	82 (90)
Liver	64 (70)
Skin	79 (86)
Platelets at the start of inolimomab, $\times 10^9/L$, median (range)	40 (2–264)
Lymphocyte count at the start of inolimomab, $\times 10^9/L$, median (range)	0.33 (0–2.5)
Albumin at the start of inolimomab, g/L, median (range)	26 (13–42)

MDS indicates myelodysplastic syndrome; MPS, myeloproliferative syndrome; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; CMV, cytomegalovirus; EBMT, European Group for Blood and Marrow Transplantation; CsA, cyclosporine A; MMF, mycophenolate mofetil; ATG, antithymocyte globulin. Advanced disease status was considered in patients with acute leukaemia in at least second CR, myeloproliferative disease in at least second chronic phase, accelerate or blast phase, Hodgkin disease in at least third complete remission or with PR, follicular lymphoma in at least third CR, large B cell lymphoma or multiple myeloma in at least second CR or PR, and solid tumors. Patients with persistent disease at transplantation (except for myeloma) were also considered as advanced disease status.

manifestations were also included. Diagnosis of aGVHD was based on clinical findings and confirmed with histological evaluation of affected organ(s). Overall grading followed the Przepiora standard criteria [14]. Failure of corticosteroids was defined by overall aGVHD grade progression within 3 days of treatment or absence of response by day 5. No patients were excluded because of active infection, progressive disease, poor performance status, or any other cause. All patients gave their informed consent, and the drug was administered as compassionate use after approval by our institutional and national health authorities. During the study, 3 patients were

considered for a clinical trial using mesenchymal cells after failure of inolimomab therapy and thus were not excluded from the analysis.

Inolimomab was administered intravenously at a dose of 11 mg/d for 3 days, 5.5 mg/d for 7 days, and 5.5 mg every other day for 5 doses (21 days per course). Sixty-five patients (71%) received 1 course of inolimomab, 25 patients (27%) received 2 courses, and 2 patients received 3 courses due to absence of response or relapse after responding to a first course of the drug. In addition to steroids, other prior immunosuppressors were not discontinued at the start of inolimomab, with the exception of patients who were on antithymocyte globulin.

Staging of target organs and the overall grade of aGVHD was done in detail at baseline and on days +7, +15, +30, and +60 of the start of inolimomab. CR was defined as the sustained disappearance of all GVHD clinical and laboratory features, whereas partial response (PR) was an overall improvement of at least 1 grade without progression in any organ. The overall response rate (ORR) includes CR plus PR rates. Those patients who showed improvement in 1 organ but progressed in another were considered to have progression of aGVHD. No response included stable, progressive aGVHD and patients who started another drug as salvage therapy.

Recent studies [8,9] have shown that the day 28 response is the strongest predictor of non-relapse mortality (NRM) after starting therapy for aGVHD. For this reason, we selected "day +30 response" as the primary early endpoint (detailed in Statistical Analysis, below). All patients received the treatment as inpatients in HEPA-filtered-air rooms. Supportive measures were considered of primary importance in these patients and included in all instances antiviral, antifungal, and cotrimoxazole prophylaxis. Serial blood monitoring of galactomanan, cytomegalovirus infection, and Epstein-Barr virus infection was done 1–3 times a week, as described elsewhere [15].

Statistical Analysis

Cross-tabs and the Student's *t* test were used to identify baseline characteristics associated with the day +30 response to inolimomab. Response and survival endpoints were calculated using the starting date of inolimomab therapy. Factors associated with ORR on day +30 in univariate analysis ($P < .05$) were then entered into a multivariate Cox regression analysis. *P* values $< .05$ were considered statistically significant, and hazard ratios and 95% confidence intervals (CIs) were calculated. Survival was estimated by the Kaplan-Meier method, and comparisons of actuarial curves were made with the log-rank test. Finally, to evaluate the impact of the day +30 response on survival, we performed a landmark analysis including only those patients who were alive on day +30 ($n = 58$).

RESULTS

Patients and GVHD Characteristics

Characteristics of the 92 patients treated are detailed in Table 1. All patients were diagnosed with hematological malignancies, and 90% had an intermediate or high European Group for Blood and Marrow Transplantation risk score before allogeneic stem cell transplantation. Donors were human leukocyte antigen-identical siblings in 52 cases (57%).

Several GVHD prophylaxis regimens were used and, in 78% of cases, were cyclosporine-based combinations (plus methotrexate or mycophenolate mofetil). The median follow-up for survivors was 60 months (range, 6–145). aGVHD occurred at a median of 34 days after transplantation (range, 5–170 days), and 94% of patients developed grade III or IV aGVHD. Involved organs were the gastrointestinal (GI) tract in 82 cases (90%), the liver in 64 (70%), and the skin in 79 (86%). Inolimomab was initiated at a median of 17 days (range, 2–204 days) after the onset of aGVHD. Forty-six patients (50%) received inolimomab as first-line salvage therapy, whereas another 46 patients received this treatment after failure of prior therapy for steroid-refractory aGVHD (see Table 1 for details).

Toxicity and Infections

Inolimomab was well tolerated, without infusion-related reactions. Two patients developed probable drug-related side effects. One of them developed a rapid increase of liver transaminases (without prior hepatic GVHD or use of parenteral nutrition), and inolimomab was discontinued after 10 days of therapy. The other patient developed a mild cutaneous rash that required only symptomatic therapy.

Complete data regarding infectious complications were available for 84 patients (91.3%). Seventy-two developed at least 1 infectious episode during the follow-up period. Cytomegalovirus reactivation was detected in 49 patients (15 with cytomegalovirus disease) at a median time of 7 days (range, +1 - +103 days) from the start of the therapy. Twenty patients (22%) developed an invasive fungal infection (14 cases of invasive aspergillosis and 4 cases of candidemia). Fifty-three patients developed at least 1 bacterial infection, being staphylococcal bacteremia the most common of these infections (n = 26 patients).

Response

The ORR on days +15, +30, and +60 of therapy was 36% (CR 2%), 42% (CR 14%), and 46% (CR 26%), respectively. Patients who received inolimomab as first-line salvage therapy presented an ORR of 39% (CR 0%), 39% (CR 13%), and 50% (CR 26%) on days +15, +30 and +60, respectively, days +15, +30, and +60. Patients without GI involvement (n = 10) responded better, with a 70% response rate compared with a 39% response rate in patients with GI involvement (n = 82; $P = .06$).

Predictors of day +30 response are shown in Table 2. In multivariate analysis, grades II to III overall aGVHD (hazard ratio, 1.8; 95% CI, 1.1 to 3.2; $P = .03$), no severe lymphocytopenia (hazard ratio, 1.9; 95% CI, 1.1-3.3; $P = .02$), and onset of inolimomab later than 15 days after aGVHD diagnosis (hazard ratio, 1.9; 95% CI, 1.1-3.4; $P = .01$) were significantly associated with response on day +30.

Two of the 3 patients diagnosed with an overlap syndrome were in PR on day 30 and achieved CR by day 60 after inolimomab. One patient is still alive in CR, whereas the other died from progression of Hodgkin's lymphoma. The third patient did not respond to inolimomab and died due to GVHD.

Survival

OS at 6, 12, and 24 months was 34% (95% CI, 24%-44%), 22% (95% CI, 13%-31%), and 18% (95% CI, 10%-26%), respectively (Figure 1). GVHD was the main cause of death, either aGVHD (49%) or chronic GVHD (13%), followed by opportunistic infections (27%). On the other hand, relapse of the underlying disease was the cause of death in only 4% of patients, even among the 42% who responded to inolimomab on day +30 (2 of 39 responders [5%] died from relapse). To analyze the impact of responding to inolimomab on survival, we performed a landmark analysis on day +30 of therapy, including only the 58 patients alive at this time (39 responders and 19 nonresponders). The OS at 6 months and 2 years was higher in responders: 6-month OS 67% (95% CI, 52%-82%) versus 26% (95% CI, 6%-46%) and 2-year OS 33% (95% CI, 18%-48%) versus 20% (95% CI, 1%-40%) ($P = .03$), respectively (Figure 1). Multivariate analysis was not done because of the small patient numbers.

DISCUSSION

In this current single-center study, the use of inolimomab as salvage therapy for steroid-refractory aGVHD was associated with prolonged survival in only 18% of patients and in approximately one-third of day +30 responding patients. The updated results confirm that inolimomab may be an active drug in this setting, with an ORR of 42%-48% on days +30 to +60 of therapy. However, the poor long-term outcomes highlight the importance of reporting long-term results in studies of steroid-refractory aGVHD [7].

Table 2
Univariate and Multivariate Risk Factor Analysis for Response to Inolimomab Therapy by Day +30 after Start of Therapy

Variable	Predictors of Day +30 Response			
	CR or PR to Salvage Inolimomab Therapy		Multivariate Analysis	
	Univariate Analysis	P	HR, 95% CI	P
Day 30 Response (%)				
EBMT risk index				
Low and intermediate risk (score 0-3)	51	.09	NA	.2
High (score 4-6)	33			
Overall aGVHD grade at inolimomab onset				
II-III	52	.03	HR 1.8, 95% CI 1.06-3	.03
IV	29			
Line of salvage therapy for refractory aGVHD				
First or second	30	.161		NT
Third or higher	23			
Courses of inolimomab				
One course, 65 (71%)	28	NS		NT
More than 1 course, 27 (29%)	25			
Lymphocyte count at the start of inolimomab				
$>3 \times 10^9/L$	51	.089	HR 1.9, 95% CI 1.1-3.3	.02
$\leq 3 \times 10^9/L$	32			
Stage of GI aGVHD at inolimomab onset				
Stage 0-II	52	.09	NA	.08
Stage III-IV	33			
Serum albumin at start of therapy				
$\geq 30g/L$	49	NS		NT
$<30g/L$	34			
CMV serostatus				
Donor and receptor negative	42	NS		NT
Donor and/or receptor seropositive	43			
HLA matching				
Mismatch HLA	40	NS		NT
No mismatch	52			
Onset of inolimomab				
After day 15	54	.021	HR 1.9, 95% CI 1.1-3.4	.01
Before day 15	29			
Year of treatment				
Before 2005	49	NS		NT
After 2005	37			

HR indicates hazard ratio; EBMT, European Group for Blood and Marrow Transplantation; NA, not available; NT, not tested; NS, not significant; GI, gastrointestinal; CMV, cytomegalovirus; HLA, human leukocyte antigen.

Variables found to improve the day +30 ORR were mostly expected (aGVHD <grade IV, no severe lymphocytopenia, and a trend for nonsevere GI involvement). The improved outcome in patients who started inolimomab therapy more than 15 days after aGVHD onset probably reflects a time-dependent selection bias; patients who survive longer after aGVHD onset and under high-dose steroids may be biologically more fit and/or have a slower-progressing (or less-aggressive) aGVHD. Supportive care has dramatically improved over the past 2 decades, and this surely contributes to the improved short-term outcome in patients who respond to salvage GVHD treatment. However, the outcome of patients with refractory GVHD has not improved over time, and because this was the cause of death in 62% of

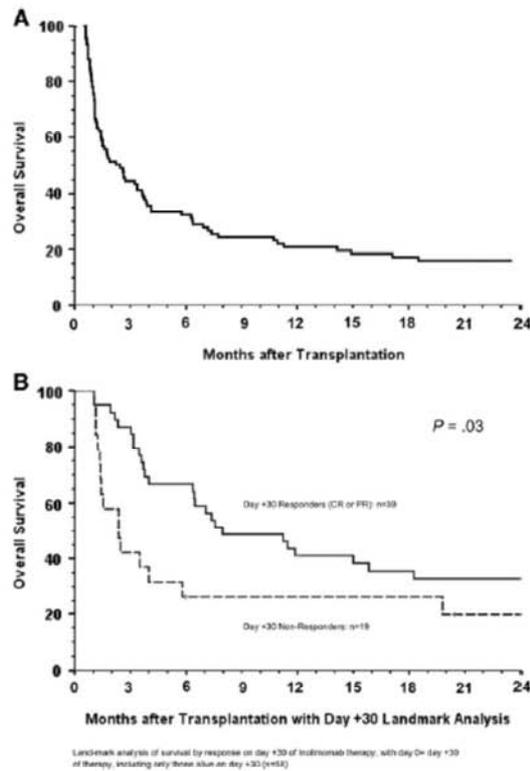


Figure 1. Two-year overall survival (A) for the whole population and (B) for day +30 responders and nonresponders.

patients in our series, we were unable to observe any possible benefit of improved supportive care.

Treatment with inolimomab was well tolerated, as previously reported [10], and the infection-related mortality (27%) was not as high as that observed with other drugs, such as antithymocyte globulin [16]. Of course, it is not possible to attribute severe infections solely to inolimomab, because these much-debilitated patients receive other immunosuppressive agents that contribute to opportunistic infections.

Despite the retrospective nature of the current study, a strong effort was put forth to meet the quality criteria recently considered important in reporting the results of secondary treatment for steroid-refractory aGVHD. In addition, the study was based on a consecutive series of patients who received the same therapy without major changes over time. Table 3 shows the compliance of our study with the 10 quality criteria recently considered important in these studies [7].

The main strengths of our report are as follows: (1) clear definition of inclusion criteria, (2) no exclusion of patients with an Eastern Cooperative Oncology Group performance status >2 or active infection, (3) no changes in inolimomab posology over time, (4) response evaluation at established time points (especially day +30 in our study, due to the predictive value of day +28 response [8,9]) with predefined criteria, (5) exclusion of patients who died before the day of evaluation in the statistical analysis, and (6) estimation of long-term survival.

A limitation of the study is the absence of a control group. In an effort to mitigate this problem, we compared our

Table 3
Martin Criteria Applied in Our Study

Criteria	Met	Explanation
1. Adequately defined eligibility criteria	Yes	Inclusion/exclusion criteria are defined in Methods. They were maintained unchanged along the time.
2. Minimization of bias in patient selection	No	A possible selection bias cannot be excluded because of the retrospective nature of our analysis. If any, the bias should affect negatively the results, as only those patients affected with refractory mild aGVHD and isolated skin involvement who responded to oral second-line therapy (as MMF or sirolimus) could be lost. Probably the included patients represent the most severe cases, which are the main problem in the clinical setting.
3. Consistent treatment regimen	Yes	All the patients received the same dose, schedule, and duration of inolimomab. Description of concomitant treatment (with the exception of corticosteroids previous days and dosage) is provided and was considered in the response and survival analysis.
4. Objective criteria for organ response	Yes	Objective criteria were used (described in Methods).
5. Unambiguous criteria for overall response	Yes	Stringent criteria were used for overall response, consisting of a global reduction of at least 1 grade in the overall evaluation without impairment in any organ. Patients with improvement in 1 organ but deterioration in another were classified as progression (detailed in Methods).
6. Prespecified time for response assessment	Yes	Response was reevaluated every week. Following the new recommendations, we analyzed the response by day +30. Deaths, relapses, and introduction of other therapies were considered and included as competitive events in the analysis.
7. Concomitant treatment taken into account	Yes	Use of new immunosuppressants after the enrollment was considered as treatment failure.
8. Well-established control benchmark	No	No control could be used. Historical cohort of patients who received other second-line agents cannot be used because support therapy deeply changed in the last 10 years.
9. Statistical hypothesis and power estimate	NA	Not applicable due to the retrospective nature of the study.
10. Survival	Yes	Survival at 6 months and 1 and 2 years from the onset of the study is shown.

MMF indicates mycophenolate mofetil; NA, not applicable.

results with those compiled in the recent extensive review by Martin et al. [7]. Due to the heterogeneity of patients with steroid-refractory aGVHD, a direct comparison of the outcomes reported herein with other studies cannot be made. Nevertheless, inolimomab does not appear to offer any advantage over other reported treatment options. The CR/PR in our study was 42% and 46% on day +30 and +60, respectively, which is similar to the 43% ORR described in a prior phase II study with an anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody [17]. In comparison, the median ORR in

the 29 studies included in a recent review [7] was 58%. In addition, the CR rate found in the current study compares poorly with the 32% median CR rate observed in prior studies, with a 95% CI of 20%–40%, and thus our 14% CR rate is lower than the estimated 95% CI of prior pooled studies. The same is applicable to the 6-month OS rate; in the review by Martin et al. [7], the median 6-month OS rate was 49% (95% CI, 40%–60%). Again, our observed 6-month OS rate of 34% (95% CI, 24%–44%) also seems statistically poorer than those observed with other drugs. Of course, our “worse-than-expected” outcomes are surely influenced by the real-life clinical use of inolimomab in the current study, thus including very sick patients who would have been excluded from prospective trials or observational studies [5,6].

In conclusion, although inolimomab is a well-tolerated drug in patients with refractory aGVHD, its activity does not seem better than reported with other drugs. More important, long-term survival in this large series of patients appears to be very low. Whether results can be improved with currently available treatments is uncertain, and efforts should be directed in participating in clinical trials testing novel therapeutic approaches.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial disclosure: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Weisford D, Haake R, Blazar B, et al. Treatment of moderate/severe acute graft versus host disease after allogeneic bone marrow transplantation: an analysis of clinical risk features and outcome. *Blood*. 1990;75:1024–1030.
- Xhaard A, Rocha V, Bueno B, et al. Steroid-refractory acute GVHD: lack of long-term improved survival using new generation anticytokine treatment. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18:406–413.
- Martin P, Rizzo JD, Wingard JR, et al. First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18:1150–1163.
- Pidala J, Anasetti C. Glucocorticoid-refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16:1504–1518.
- Alousi AM, Weisdorf DJ, Logan BR, et al. Etanercept, mycophenolate, denileukin, or pentostatin plus corticosteroids for acute graft-versus-host disease: a randomized phase 2 trial from the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. *Blood*. 2009;114:511–517.
- BMT CTN Protocol 0802. A multi-center, randomized, double blind, phase III trial evaluating corticosteroids with mycophenolate mofetil vs. corticosteroids with placebo as initial systemic treatment of acute GVHD. Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. Request for Proposal RFP C10-0047.
- Martin P, Inamoto Y, Flowers ME, Carpenter PA. Secondary treatment of acute graft versus host disease: a critical review. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18:982–988.
- Saliba RM, Couriel DR, Giralt S, et al. Prognostic value of response after upfront therapy for acute GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47:125–131.
- Levine JE, Logan B, Wu J, et al. Graft-versus-host disease treatment: predictors of survival. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16:1693–1699.
- Bay J, Dhédin N, Goerner M, et al. Inolimomab in steroid-refractory acute graft versus host disease following allogeneic stem cell transplantation: retrospective analysis and comparison with other interleukin-2 receptor antibodies. *Transplantation*. 2005;80:782–788.
- Schub N, Günther A, Schrauder A, et al. Therapy of steroid-refractory acute GVHD with CD52 antibody alemtuzumab is effective. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46:143–147.
- Busca A, Locatelli F, Marmont F, et al. Recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor fusion protein as treatment for steroid refractory graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol*. 2007;82:45–52.
- Piñana JL, Valcárcel D, Martino R, et al. Encouraging results with inolimomab (anti-IL-2 receptor) as treatment for refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12:1135–1141 [Erratum in: *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:124].
- Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, et al. 1994 Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant*. 1995;15:825–828.
- Piñana JL, Martino R, Barba P, et al. Cytomegalovirus infection and disease after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation: single-centre experience. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45:534–542.
- Hsu B, May R, Carrum G, et al. Use of antithymocyte globulin for treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease: an international practice survey. *Bone Marrow Transplant*. 2001;28:945–950.
- Hervé P, Wijdenes J, Bergerat JP, et al. Treatment of refractory acute graft versus host disease by in vivo administration of anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody (B-810). *Blood*. 1990;75:1017–1023.

6.3. Patrones de infección y mortalidad de causa infecciosa en la EICR aguda refractaria a esteroides.

6.3. a. Diseño del estudio:

Se incluyeron 127 pacientes adultos con hemopatías malignas que desarrollaron una EICR aguda grado II-IV refractaria a esteroides y se trataron con inolimomab o etanercept en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y el Hospital Vall d'Hebrón de Barcelona, entre enero de 1999 y junio de 2015. Cabe destacar que los dos centros participantes en el estudio utilizaron plataformas de TPH muy similares y compartieron también las estrategias de profilaxis y tratamiento de la EICR, así como el abordaje de las complicaciones infecciosas.

Los criterios de inclusión fueron: diagnóstico de EICRa grado 2-4 córtico-refractaria tras alo-TPH por una hemopatía maligna y tratamiento de rescate con inolimomab y/o etanercept en segunda línea o fases posteriores. Se incluyeron pacientes con EICRa clásica y de inicio tardío así como casos de “Overlap Syndrome” con predominio de la afectación aguda.

Inolimomab y etanercept se utilizaron como “uso compasivo”. La administración de inolimomab fue endovenosa en dosis de 11 mg/d durante 7 días y posteriormente 5.5 mg cada 48 horas hasta completar un total de 5 dosis (ciclo de 21 días). Etanercept se administró vía subcutánea en dosis de 25 mg dos veces por semana durante 4 semanas y posteriormente cuatro dosis adicionales de 25 mg una vez por semana. Además de los esteroides, todos los pacientes mantuvieron la profilaxis y/o tratamiento previo recibido frente a la EICR excepto en el caso de la ATG, que se suspendió con anterioridad.

Se definió como MRI todo fallecimiento atribuido a una infección reciente por el médico a cargo del paciente y la coordinadora del estudio (IGC). Se recogieron todas las infecciones bacterianas, víricas o IFIs que requirieron tratamiento endovenoso o prolongaron la estancia hospitalaria. También se documentaron todos los casos de infección /enfermedad por CMV y VEB. Los datos se recogieron de forma retrospectiva e incluyeron todos los episodios de infección grave desde el inicio de inolimomab/etanercept hasta el fallecimiento o última evaluación clínica del paciente.

Los objetivos principales del estudio fueron el análisis de la IAc de muerte de etiología infecciosa y el establecimiento de factores de riesgo asociados a su aparición. Los objetivos secundarios incluyeron la descripción de los principales tipos de infección severa, sus agentes responsables y el análisis del impacto del tipo de tratamiento de rescate en la supervivencia.

Debemos destacar que todos los períodos de tiempo analizados en el estudio se refieren al momento de diagnóstico de la refractariedad a esteroides y no a la fecha de TPH, a no ser que se especifique lo contrario.

6.3. b. Resultados:

Características de la población

La edad mediana fue de 51 años (rango 17-70) siendo el 69% varones. Un 70% presentaban un EBMT risk score intermedio o alto. Noventa y cinco pacientes (75%) presentaban una serología pre-TPH positiva frente a CMV y 89 (70%) habían sufrido al menos una infección grave antes del diagnóstico de EICR refractaria. Un 73% de los pacientes recibió en algún momento profilaxis antifúngica activa frente a hongos filamentosos. La media de seguimiento de los supervivientes fue de 583 (37-5329) días. Los pacientes desarrollaron EICRa en una mediana de 34 días desde el TPH (rango: 7-250). En el momento del diagnóstico de refractariedad a esteroides un 6% presentaban EICR grado global II, un 56% grado III y un 38% grado IV. Ciento diecinueve casos (94%) presentaban afectación digestiva, noventa y cinco (75%) hepática y 88 (69%) cutánea.

El tratamiento con inolimomab/etanercept se inició tras una mediana de 14 días (rango 4-122) después del diagnóstico de EICR. Inolimomab fue el fármaco elegido en 98 casos (77%) mientras que el 23% restante recibieron etanercept. Inolimomab se utilizó como primera línea de rescate en 46 de los 98 casos (46%). El resto había recibido previamente otros inmunosupresores. Doce de los 29 pacientes tratados con etanercept (41%) lo recibieron como primer rescate. La respuesta global de la EICR en el día +28 desde el inicio de tratamiento con AcMo fue del 42.5% (14% RC), sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre inolimomab y etanercept.

Incidencia de infección grave y gérmenes responsables

Setenta y siete pacientes (61%) desarrollaron una infección bacteriana grave tras una mediana de 36 días (rango 0-3321) desde el diagnóstico de refractariedad a esteroides. Un 34% sufrió más de un episodio. La IAc de bacteriemia a un año fue del 73.5% (IC95% 63.5-83.5). Alrededor de un tercio de los casos se debió a estafilococos coagulasa-negativos, mientras que las infecciones por enterococo afectaron a un 27% de los pacientes. Los agentes gram-negativos fueron responsables de 24 episodios (19%) y 6 pacientes (4.7%) desarrollaron una colitis por C.difficile. En total se identificaron 7 casos (5.7%) de infección por bacterias multiresistentes,

siendo el germen más frecuente *S. maltophilia* (3 casos). En 25 casos (32%) la infección bacteriana llevó a la muerte del paciente.

Dieciseis pacientes (12.6%) presentaron una IFI, incluidos los casos probables y probados. La aspergilosis invasiva fue la más habitual (87%), además de un caso de mucormicosis y una fusariosis. Cinco de los 16 pacientes que desarrollaron una IFI recibían profilaxis con amfotericina lipídica en dosis de 1 mg/kg/d. La Iac de IFI a un año fue del 14.2% (IC95% 4.4-20). El 75% de los casos ocurrió en los primeros 100 días tras el diagnóstico de EICR resistente, con una mediana hasta el diagnóstico de 28 días (rango: 3-2575).

La tasa de reactivaciones de CMV fue del 51.2% con una IAc a 100 días y un año del 57.3% (IC95% 47-68) y el 67.5% (IC95% 57-79) respectivamente. Un 35% de los pacientes presentaron más de una reactivación. Dieciocho pacientes (14%) presentaron “enfermedad por CMV”. El órgano más frecuentemente afectado fue el tracto digestivo (n=11) seguido por el pulmón (n=7). Sólo un paciente falleció por dicha infección.

Veinte pacientes (16%) presentaron una cistitis hemorrágica grado II-IV tras una mediana de 31 días desde el diagnóstico de córtico-refractariedad (rango: 0-94). Cuatro de los 79 pacientes incluidos en la monitorización seriada mediante PCR cuantitativa de VEB (5%) presentaron una reactivación del virus. Únicamente se diagnosticó un caso de SLP-PT asociado a VEB, que fue previo a la introducción rutinaria del screening de viremia como práctica estándar. Un 13.4% de los pacientes desarrolló una neumonía asociada a virus respiratorios adquiridos en la comunidad, con 8 de los 17 casos (47%) identificados en largos supervivientes, fundamentalmente en relación con la presencia de EICRc moderada o severa activa.

Mortalidad asociada a infección y Supervivencia Global

En primer término se analizó el impacto del año de realización del TPH (y del desarrollo de EICR refractaria) en los resultados a largo plazo, y se objetivó que la MRT, la MRI y la SG eran equivalentes a lo largo del tiempo.

La probabilidad de SG a los 4 años fue del 15% (IC95%, 7.7-22). La causa más frecuente de exitus fue la EICR, aguda (56%) o crónica (10%), seguida por las infecciones oportunistas (27.6%). Las muertes asociadas a infección ocurrieron tras una mediana de 88 días (rango: 12-802) desde el diagnóstico de córtico-resistencia, con un 55% de los fallecimientos en los primeros 100 días. Las infecciones bacterianas fueron la causa más frecuente de MRI (20/29), seguidas por las IFI y las neumonías por virus respiratorios comunitarios (4/29 cada una). Las recaídas de la enfermedad de base fueron infrecuentes y se consideraron la causa principal de muerte en sólo 5 casos (4%).

Factores de riesgo de muerte asociada a infección

Las variables que se asociaron con un mayor riesgo de MRI en el análisis multivariado fueron: 1) administración de rituximab en los 6 meses previos al alo-TPH (HR 4.2; IC95% 1.1-16.3), 2) presencia de una infección severa antes del desarrollo de EICR refractaria (HR 5.8; IC95% 1.3-26.3) y 3) proteína C reactiva > a 15 UI/ml al inicio del tratamiento de rescate (HR 2.9; IC95% 1.1-8.5).

Infecciones tardías y MRI en largos supervivientes

Veintiún pacientes (17%) seguían vivos y libres de enfermedad más de un año después del diagnóstico de EICR refractaria. Prácticamente todos (90%) desarrollaron una o más infecciones tardías graves. Dos pacientes con EICRc moderada presentaron cuadros sépticos secundarios a bacterias encapsuladas y cinco (24%) una neumonía asociada a virus respiratorios adquiridos en la comunidad. Se documentaron además 5 casos de infección grave por virus herpes simple o zóster. Once de los veintún pacientes fueron finalmente exitus a una mediana de 870 días (rango: 369-3723) tras el diagnóstico de resistencia a esteroides. En esta subpoblación, la EICRc fue considerada la causa principal de muerte en el 56% de los casos, seguida por las infecciones oportunistas (26%) y las recaídas de la enfermedad de base (18%).

Los resultados de este trabajo fueron publicados en forma de artículo en la revista Bone Marrow Transplantation. A continuación se aporta una copia del trabajo en su formato original.

ORIGINAL ARTICLE

Patterns of infection and infection-related mortality in patients with steroid-refractory acute graft versus host disease

I García-Cadenas¹, I Rivera², R Martino¹, A Esquirol¹, P Barba², S Novelli¹, G Orti², J Briones¹, S Brunet¹, D Valcarcel^{2,3} and J Sierra^{1,3}

This study aimed to characterize the incidence, etiology and outcome of infectious episodes in patients with steroid refractory acute GvHD (SR-GvHD). The cohort included 127 adults treated with inolimomab (77%) or etanercept (23%) owing to acute 2–4 SR-GvHD, with a response rate of 43% on day +30 and a 4-year survival of 15%. The 1-year cumulative incidences of bacterial, CMV and invasive fungal infection were 74%, 65% and 14%, respectively. A high rate (37%) of enterococcal infections was observed. Twenty patients (15.7%) developed BK virus-hemorrhagic cystitis and five percent had an EBV reactivation with only one case of PTLD. One-third of long-term survivors developed pneumonia by a community respiratory virus and/or encapsulated bacteria, mostly associated with chronic GvHD. Infections were an important cause of non-relapse mortality, with a 4-year incidence of 46%. In multivariate analysis, use of rituximab in the 6 months before SCT (hazard ratio; HR 4.2; 95% confidence interval; CI 1.1–16.3), severe infection before SR-GvHD onset (HR 5.8; 95% CI 1.3–26.3) and a baseline C-reactive protein > 15 U/ml (HR 2.9; 95% CI 1.1–8.5) were associated with infection-related mortality. High rates of opportunistic infections with remarkable mortality warrant further efforts to optimize long-term outcomes after SR-GvHD.

Bone Marrow Transplantation advance online publication, 5 September 2016; doi:10.1038/bmt.2016.225

INTRODUCTION

Acute GvHD (aGvHD) is the most important cause of non-relapse mortality (NRM) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloSCT).¹ Refractoriness to steroids, which occurs in ~50% of patients, is associated with a dismal prognosis. Although multiple second-line therapies have been tested, none of them has remarkably improved long-term outcomes.²

In 2013 our group published a large series of patients who received inolimomab, a monoclonal Ab targeting the interleukin-2 receptor, as salvage therapy for steroid refractory (SR)-GvHD.³ Only one-third of responding patients became long-term survivors and opportunistic infections were a major concern, being the main cause of death in 27% of the cases. Severe infections have also been described after the use of other salvage agents for SR-GvHD,⁴ although there is a paucity of studies specifically focusing on etiology and outcome of these complications.

In the current study we analyze the occurrence, risk factors and impact on long-term outcomes of severe infections in patients with SR-GvHD treated with inolimomab (before 2014) or etanercept, a TNF-alpha inhibitor (since 2014).

PATIENTS AND METHODS

Inclusion criteria and transplant characteristics

Between January 1999 and June 2015, 127 adult patients developed grade 2–4 SR-acute GvHD after alloSCT at the Hospitals Sant Pau and Vall d'Hebrón in Barcelona and received salvage treatment with inolimomab or etanercept. Both institutions shared homogenous transplantation platforms, including GvHD management and anti-infectious measures. The follow-up of cases from a previous study³ was updated and additional data were included.

Patients with classical and late-onset aGvHD, as well as those with overlap syndrome but with predominantly features of acute GvHD were included.

Supportive care and anti-infectious prophylaxis. Supportive measures included in all instances antiviral and antifungal prophylaxis, and cotrimoxazole or pentamidine prophylaxis. Antiviral prophylaxis consisted of low-dose acyclovir (400 mg twice a day intravenously or its equivalent oral doses). Broad spectrum (other than fluconazole) antifungal prophylaxis was used in 92 (73%) patients (see Table 1). However, the timing and duration of prophylaxis varied considerably between patients. Serial blood monitoring using quantitative PCR for CMV and EBV infection was done 1–2 times a week.⁵ EBV monitoring was introduced in 2006. Pre-emptive anti-CMV therapy was started after PCR > 1000 DNA viral genome/mL in one serum sample or two consecutive samples with > 500 copies/mL. Patients with EBV viral loads > 1000 copies/mL on at least two consecutive occasions or those with one determination > 2000 copies/mL were treated with rituximab. Serum galactomannan (2–3 times per week) was included in the monitoring strategy in patients receiving fluconazole prophylaxis.

Anti-cytokine treatment schedule. Inolimomab was administered intravenously at a dose of 11 mg/day for 3 days, 5.5 mg/day for 7 days, and 5.5 mg every other day for five doses (21 days per course). Sixty-six patients (52%) received one course of inolimomab and 32 (22%) received two courses owing to absence of response or relapse after responding to a first course. Etanercept was administered subcutaneously at a dose of 25 mg two times per week for four doses and 25 mg once per week for other four doses. Twenty-eight patients (22%) received one course of etanercept and one received two courses. In addition to steroids, other prior immunosuppressors were not discontinued at the start of the anti-cytokine treatment.

¹Hematology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, José Carreras Leukemia Research Institute and IIB Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain and ²Hematology Department, Hospital Vall d'Hebrón, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. Correspondence: Dr I García-Cadenas, Hematology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, José Carreras Leukemia Research Institute and IIB Sant Pau, Mas Casanovas, 90, Barcelona 08035, Spain. E-mail: IGarciaCa@santpau.cat

³These authors contributed equally to this work.

Received 30 May 2016; revised 7 July 2016; accepted 12 July 2016

Table 1. Transplant related characteristics and GvHD outcomes

	n = 127	
	Inolimomab (n = 98 (77%))	Etanercept (n = 29 (23%))
Median age (range), years	50 (17–70)	52 (22–68)
≥ 40	75 (76%)	22 (76%)
Male sex	72 (73%)	16 (55%)
Sex mismatch–female donor/ male recipient	29 (29.6%)	5 (17.2%)
Underlying disease		
AML/MDS	27/18	15/7
ALL	7	2
CML/other CMPs	8/4	0/1
NHL	22	3
HD	4	0
MM	5	1
Others	4	0
Non-early disease status at transplant	57 (58%)	14 (48%)
Prior SCT	30 (31%)	2 (7%)
Rituximab in the 6 months before SCT	12 (12.2%)	1 (3.4%)
Recipient CMV IgG positive	72 (73.5%)	23 (79%)
Time period of transplant		
2000–2005	48 (49%)	0
2006–2015	50 (51%)	29 (100%)
Reduced intensity conditioning TBI-based conditioning	73 (74.5%) 23 (23.5%)	16 (55.2%) 6 (20.7%)
Stem cell source		
PB	86 (88%)	26 (89.7%)
BM	7 (7.1%)	0
CB	5 (5.1%)	3 (10.3%)
Donor type		
Identical sibling	54 (55.1%)	9 (31%)
Alternative	44 (44.6%)	20 (69%)
In vivo T-cell depletion during conditioning	21 (21.4%)	10 (34.5%)
GvHD prophylaxis		
Cyclosporine-based	93 (95%)	23 (79.5%)
Sirolimus-Tacrolimus	5 (5%)	6 (20.5%)
Age HCT-CI		
Low (0–1)	42 (43%)	14 (48.2%)
Intermediate (2–3)	36 (36.7%)	10 (34.5%)
High (≥4)	20 (20.4%)	5 (17.2%)
EBMT risk index		
Low (0–1)	5 (5.1%)	2 (7%)
Intermediate (4)	28 (28.6%)	11 (38%)
High (5–7)	65 (66.3%)	16 (55%)
Disease-risk index		
Low	16 (16.3%)	1 (3.4%)
Intermediate	51 (52%)	11 (38%)
High or very high	25 (25.5%)	17 (58.6%)
Broad spectrum antifungal prophylaxis ^a	65 (69%)	27 (93%)
Severe infections before SR-GvHD diagnosis		
Yes	71 (72.4%)	18 (62.1%)
Different (new) infection after SR-GvHD	50 (70.4%)	7 (39%)
Same (recurrent) infection after SR-GvHD ^b	21 (29.6%)	11 (61%)

Table 1. (Continued)

	n = 127	
	Inolimomab (n = 98 (77%))	Etanercept (n = 29 (23%))
aGvHD- median day onset (range)	32 (7–204)	41 (8–250)
Overall aGvHD at start of anti-cytokine treatment		
II	6 (6.1%)	2 (7%)
III	51 (52%)	20 (69%)
IV	41 (41.8%)	7 (24%)
Organs involved at start of anti-cytokine treatment		
GI	92 (94%)	27 (93%)
Liver	74 (75.5%)	21 (72.4%)
Skin	70 (71.4%)	18 (62%)
Median time from aGvHD- onset to diagnosis of refractoriness to steroids (range), days	11 (0–91)	10 (2–122)
Median time from aGvHD- onset to start of anti-cytokine treatment (range), days	15 (4–91)	12 (5–122)
Anti-cytokine treatment as first salvage	45 (46%)	12 (42%)
Platelets ($\times 10^9/L$) at start of anti- cytokine treatment, median (range)	40 (5–288)	67 (7–351)
Lymphocytes ($\times 10^9/L$) at start of anti-cytokine treatment, median (range)	0.3 (0–2.5)	0.3 (0–4.3)
Albumin (g/L) at start of anti- cytokine treatment, median (range)	26 (13–45)	28 (16–43)
Monocytes ($\times 10^9/L$) at start of anti-cytokine treatment, median (range)	0.26 (0–1.7)	0.25 (0–1.8)
Neutrophils ($\times 10^9/L$) at start of anti-cytokine treatment, median (range)	3.2 (0–16)	2.5 (0–20)
C-reactive protein (mg/L) at start of anti-cytokine treatment, median (range)	20 (0.1–344)	11 (26–169)
ORR at day +28 after anti-cytokine treatment		
CR or PR	38 (39%)	16 (55%)
NR	25 (25.5%)	7 (24%)
NA	35 (35.6%)	6 (20.7%)
Median days follow-up in survivors (range), days	3723 (180–5329)	377 (112–1063)

Abbreviations: BM = bone marrow; CB = cord blood; CMPs = chronic myeloproliferative syndrome; GI = gastrointestinal tract; HD = Hodgkin disease; MDS = myelodysplastic syndrome; MM = multiple myeloma; NA = not available; NHL = non-Hodgkin lymphoma; NR = no response; ORR = overall response rate; PB = peripheral blood; SCT = stem cell transplantation; SR-GvHD = steroid refractory acute GvHD. ^aBroad spectrum AFP was: low dose (1 mg/kg/day) amphotericin B for 60 patients, posaconazol (n = 10), itraconazol (n = 8), caspofungin (n = 8), voriconazol (n = 3), 3 mg/kg amphotericin B (n = 2) and micafungin in one case. ^bThe recurrent cases of infection included 18 bacterial infections (six coagulase-negative staphylococci, six enterococcus, three *P. aeruginosa*, two *E. Coli* and one *Clostridium difficile*) and 14 cases of CMV reactivation.

Definitions

Risk assessment. Advanced disease status was defined as acute leukemia in ≥ 2nd CR, myeloproliferative disease in accelerated/blast phase or ≥ 2nd CR, Hodgkin's disease and follicular lymphoma in ≥ 3rd CR, and large B-cell lymphoma or multiple myeloma in ≥ 2nd CR. Patients with PR or persistent disease at SCT (except for multiple myeloma) were also considered as advanced disease status.

GvHD-related. Diagnosis of aGvHD was based on clinical findings and confirmed with histological evaluation if possible. The overall grading system established by Przepiorka et al.⁵ was used. Grades II–IV were treated with prednisone, usually 2 mg/kg/day. Failure of corticosteroids was defined as overall aGvHD grade progression within 4 days of treatment, absence of any response by day 7 or less than partial response by day 14. No patients were excluded because of active infection, poor performance status, or any other cause. All patients gave their informed consent, and the monoclonal Ab was administered as compassionate use after approval by the institutional and national health authorities.

GvHD response was assessed weekly after the initiation of rescue therapy. CR was defined as the sustained disappearance of all GvHD-related clinical and laboratory features, whereas PR was an overall improvement of at least one grade without progression in any organ. The overall response rate included CR plus PR rates. Improvement in one organ but progression in another was considered progression. No response included stable or progressive aGvHD and/or the need for additional salvage therapy.

Infection-related definitions. Infection-related mortality (IRM) was defined as death attributable to a recent severe infection by the primary physician (s) and the coordinator of the study (IG). Any bacterial, viral or invasive fungal infection (IFI) requiring Iv. treatment or prolonging hospitalization were also included. All cases of CMV and EBV infection were reported. Infection data were collected retrospectively until the patient's death or last follow-up according to the Infectious Diseases Working Party of the EBMT guidelines (<http://www.ebmt.org/Contents/About-EBMT/WhoWeAre/ScientificCouncil/Documents/IDWPdefinitions.pdf>). Other severe viral infections included were: (i) disseminated varicella-zoster virus (VZV) infection; (ii) Human Herpesvirus 6 encephalitis, diagnosed by positive PCR from cerebrospinal fluid; (iii) Adenovirus disease, diagnosed when adenovirus was identified in samples from an affected organ(s) by immunohistochemistry; (iv) pneumonia owing to a community respiratory virus; and (v) BK polyomavirus-related hemorrhagic cystitis.^{7–9}

Statistical analysis

The primary end point of the study was analyzing the cumulative incidence (Cum.Inc.) of IRM and establishing its major risk factors, whereas secondary end points were description of the major types of severe infections and the possible impact of the type of salvage anti-cytokine used on the risk of IRM. Crosstabs and Student's t-test were used to identify baseline characteristics associated with this end point. Factors with *P*-value < 0.1 in univariate analysis were entered into a multivariate proportional hazards Cox regression analysis.¹⁰ *P*-values < 0.05 were considered statistically significant, and the hazard ratios (HRs) and their 95% confidence intervals (95% confidence interval; CIs) were calculated. All outcomes except OS were analyzed as Cum.Inc. with the corresponding competing risk factors. Data were analyzed using SPSS.V.15 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) and the CMPSK package in R 2.4.1. Unless specified otherwise, all time periods described and analyzed refer to the onset of SR-GvHD and not to day 0 of the SCT.

RESULTS

Patient characteristics

Table 1 summarizes the study population. The median age was 51 years (range: 17–70) and 94.5% had an intermediate or high (≥4) EBMT risk score before SCT. Ninety-five patients (75%) were CMV seropositive and 89 (70%) had presented a severe infection before SR-GvHD development. Broad spectrum antifungal prophylaxis that is, active against invasive mold infections, was used at some point in 92 cases (73%). The median follow-up for survivors was 583 (37–5329) days.

GvHD outcomes

Acute GvHD occurred at a median of 34 days after alloSCT (range 7–250). Eight patients (6.3%) had grade II, 71 (56%) grade III and 48 (37.8%) grade IV aGvHD when refractoriness to steroids was established. Involved organs were the gastrointestinal tract in 119 cases (93.7%), the liver in 95 (74.8%) and the skin in 88 (69.3%) cases. Salvage anti-cytokine therapy was started at a median of 14 (range: 4–122) days after GvHD onset. Inolimomab was the rescue option in 98 patients (77.2%), whereas 29 (22.8%) received

Table 2. Incidence of severe infection by type and time period (n = 127)

Severe bacterial infections	77 (60.6%)
Median onset (days, range)	36 (0–3321)
100 days Cum.Inc. (95% CI)	62.6% (52.6–72.6)
1-year Cum.Inc. (95% CI)	73.5% (63.5–83.5)
Coagulase-negative staphylococci	45 (35.4%)
<i>Enterococcus faecalis/faecium</i>	12/23 (9.4/18%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12 (9.4%)
<i>Escherichia coli</i>	13 (10.2%)
Extended-spectrum beta-lactamase <i>E. coli</i>	3 (2.3%)
<i>Clostridium difficile</i> -related diarrhea	6 (4.7%)
More than one severe infection	44 (34.6%)
Severe viral infections	
CMV infection without disease	65 (51.2%)
Median onset (days, range)	15 (0–390)
100 days Cum.Inc. (95% CI)	57.3% (46.8–68)
1-year Cum.Inc. (95% CI)	67.5% (52.9–78.6)
Recurrent (≥2 episodes) of CMV infection	44 (35%)
CMV disease	18 (14%)
Early (< day +30 after SR-GvHD diagnosis)	10 (55.5%)
EBV infection without PTLD (only PCR+)	4/79 (5.1%)
EBV-related PTLD	1 (0.8%)
Other HHV infections	
HSV or VZV infections (HSV/VZV)	16 (12.6%)
Systemic adenovirus disease	7 (5.5%)
LRTI by community respiratory virus ^a	17 (13.4%)
Median onset (days, range)	80 (7–1142)
BK polyomavirus-related hemorrhagic cystitis	20 (15.7%)
Median onset (days, range)	31 (0–94)
Invasive fungal infections	
Probable or proven invasive mould infection ^b	16 (12.6%)
Median onset (days, range)	28 (3–2575)
100 days Cum.Inc. (95% CI)	12.2% (2.5–6.5)
1-year Cum.Inc. (95% CI)	14.2% (6.6–21.8)
Period after SR-GvHD diagnosis (% of cases)	
Early (< day +30)	10 (62.5%)
Invasive candidiasis and other yeast infections	2 (1.6%)

Abbreviations: BM = bone marrow; CB = cord blood; Cum.Inc. = cumulative incidence; CI = confidence interval; HD = Hodgkin disease; HHV = human herpesvirus; LRTI = lower respiratory tract infection; NHL = non-Hodgkin lymphoma; PB = peripheral blood; PTLD = post-transplant lymphoproliferative disease. ^aRespiratory viruses isolated from lower respiratory tract samples included six influenzae, six respiratory syncytial virus, three parainfluenzae, one rinovirus and one metaneupomavirus. ^bMould infections were caused by *Aspergillus* spp in 14 cases. One case was due to a mucor and there was one IFI due to *Fusarium* spp.

etanercept. Forty-five of the 98 patients (46%) in the inolimomab group and 12 of the 29 (41.3%) in the etanercept group received the monoclonal Ab as first-salvage treatment. The remaining patients received this treatment after failure of prior salvage therapy. The overall response rate on day +28 was 42.5% (CR 14%) without differences between both monoclonal Ab (see Table 1 for details).

Nature and incidence of severe infections

The incidence of the major severe infections by type and time period are summarized in Table 2.

Bacterial and fungal infections. Seventy-seven patients (61%) had severe bacterial infections at a median of 36 days (range: 0–3321) after the diagnosis of SR-GvHD, with 34% having > 1 episode.

The 1-year Cum.Inc. of bacteremia was 73.5% (95% CI 63.5–83.5). Forty-five cases (35.4%) were due to coagulase-negative Staphylococci, while enterococcal bacteremia was documented in 35 (27%) cases. Infections by Gram-negative bacteria occurred

Table 3. Overall IRM, specific infections, NRM and OS (n = 127)	
4-year IRM, n	29/127 (22.8%)
100 days Cum.Inc. (95% CI)	17.6% (9.4–25.8)
1-year Cum.Inc. (95% CI)	36.5% (24.1–48.9)
4-year Cum.Inc. (95% CI)	46% (31.2–61)
<i>Time period of IRM post SR-GvHD diagnosis</i>	
Early (before day +30)	7/29 (24.1%)
Intermediate (days +31 to +100)	9/29 (31%)
Late (after day +100)	13/29 (44.8%)
Median time to IRM, days (range)	88 (12–802)
<i>Microbiological cause of IRM</i>	
Bacterial infection	20/29 (69%)
Community respiratory virus	4/29 (13.8%)
Invasive fungal infections	4/29 (13.8%)
CMV disease	1/29 (3.4%)
4-year NRM, n	100/127 (78.7%)
100 days Cum.Inc. of NRM (95% CI)	54.6% (50.8–58.4%)
1-year Cum.Inc. of NRM (95% CI)	73.2% (69.8–76.6%)
4-year Cum.Inc. of NRM (95% CI)	82.3% (77.3–85.3%)
Median time to NRM (from SR-GvHD diagnosis), days (range)	43 (4–2760)
Relapse of the underlying malignancy/death from relapse	8/127 (6.3%)/5/127 (3.9%)
Median time from SR-GvHD to relapse, days (range)	263 (48–2469)
4-year OS, n	22/127 (17.3%)
100 days Cum.Inc. of OS (95% CI)	45.4% (36.6–54.2%)
1-year Cum.Inc. of OS (95% CI)	24% (16–30%)
4-year Cum.Inc. of OS (95% CI)	14.9% (7.7–22.1)
Median time from SR-GvHD to death, days (range)	43 (4–2760)
<i>Primary cause of death</i>	
Acute GvHD	59/105 (56.1%)
Chronic GvHD	10/105 (9.5%)
Infection	29/105 (27.6%)
Relapse	5/105 (4.7%)
Others ^b	2/105 (2.8%)

Abbreviations: Cum.Inc.=cumulative incidence; IRM=infection-related mortality; NRM=non-relapse mortality; OS=overall survival; SR-GvHD=steroid refractory acute GvHD; 95% CI=95% confidence interval. 1 PTLD, 1 disseminated VZV, 1 disseminated adenovirus; SR-GvHD steroid refractory graft versus host disease; aGvHD: acute GvHD; cGvHD: chronic GvHD. 1 Severe hemorrhage, 1 distress respiratory syndrome.

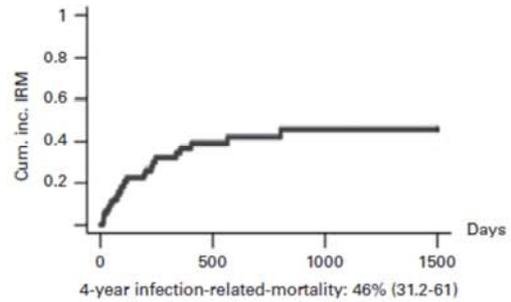


Figure 1. Four-year infection-related mortality (IRM) cumulative incidence estimate from a competing risk model, calculated for all 127 patients from the start of salvage therapy for steroid-refractory acute GvHD. A full color version of this figure is available at the *Bone Marrow Transplantation* journal online.

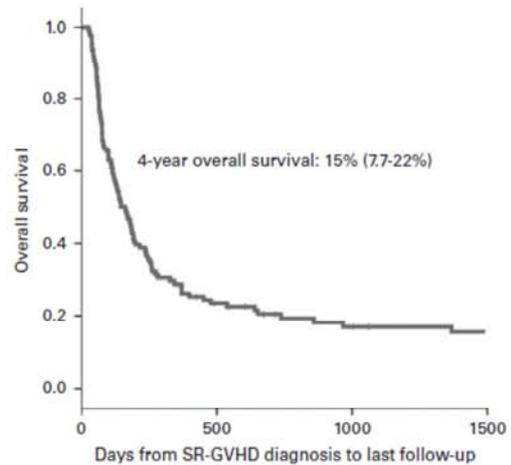


Figure 2. 4-year overall survival probability estimate, calculated for all 127 patients from the start of salvage therapy for steroid-refractory acute GvHD. A full color version of this figure is available at the *Bone Marrow Transplantation* journal online.

in 24 cases (19%), and six patients (4.7%) presented *C. difficile*-related colitis. We identified seven patients (5.7%) who developed multidrug-resistant infection. The most frequent organisms were as follows: *Stenotrophomonas maltophilia* (3), vancomycin-resistant enterococci (2), *Acinetobacter Baumannii* (1), *Pseudomonas aeruginosa* (1). In 25 cases (32%) bacterial infections were fatal.

Sixteen patients (12.6%) developed an IFI, including probable and proven forms. Invasive aspergillosis was the most common IFI, accounting for 87% of cases, in addition to one case of mucormycosis and one fusariosis. Five patients were under low dose Amphotericin B lipid complex prophylaxis (1 mg/kg/days) at the time of IFI diagnosis. The 1-year Cum.Inc. of invasive aspergillosis was 14.2% (95% CI 4.4–20). Most of the cases (75%) occurred in the first 100 days of SR-GvHD, with a median onset of 28 days (range 3–2575).

CMV and other viral infections. The rate of CMV reactivation was 51.2%, with a 100-day and 1-year Cum.Inc. of 57.3% (95% CI 47–68%) and 67.5% (95% CI 56.6–79%), respectively. Forty-four patients (34.6%) had one or more recurrent episodes. CMV disease

occurred in 18 patients, in six of them without a prior diagnosis of CMV infection. The organ involved was predominantly the gastrointestinal tract (n=11), followed by the lung (n=7). Only one patient died owing to CMV disease.

Twenty patients (16%) had grades II to IV BK polyomavirus-related hemorrhagic cystitis at a median of 31 days after the diagnosis of SR-GvHD (range: 0–94). EBV infection was documented in 4 of the 79 monitored patients (5.1%). The only case of EBV-related PTLD occurred before the introduction in our standard practice of routine PCR screening for EBV DNAemia.

Pneumonia by a community respiratory virus was found in 13.4% of patients, with several cases (8/17) documented in long-term survivors (>1 year after the onset of SR-GvHD) who suffered moderate-to-severe cGvHD. Other severe viral infections are shown in Table 2.

IRM and OS

Table 3 shows in detail the number, incidence and causes of IRM, NRM and deaths owing to relapse. Initially, we analyzed the

Table 4. Univariate and multivariate analysis of the 4-year IRM

Variables	4-year IRM			
	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	Cum.Inc. (95% CI)	P-value	P-value	HR (95% CI)
Recipient age, in years				
≤40 (n = 30)	36.5% (20.3–52.7)	0.07	0.2	
>40 (n = 97)	52% (34.8–69.2)			
GvHD prophylaxis				
CsA-based (n = 116)	51.4% (35.6–67.2)	0.04	0.9	
Sirolimus+Tacrolimus (n = 11)	0%			
Rituximab 6 months before SCT				
No (n = 114)	41.2% (26.6–55.8)	0.07	0.03	4.2 (1.1–16.3)
Yes (n = 13)	69.7% (64.7–84.7)			
Severe infections prior anti-cytokine				
No (n = 37)	21.6% (3.8–39.4)	0.03	0.02	5.8 (1.3–26.3)
Yes (n = 86)	59% (40.4–77.6)			
Lymphocytes < 0.3 x 10⁹/L^a				
No (n = 65)	41.6% (21.4–62.8)	0.1	0.3	
Yes (n = 62)	53% (29.9–75.9)			
Albumin < 25 g/dL^a				
No (n = 76)	41.2% (21.2–61.2)	0.04	0.5	
Yes (n = 51)	56.9% (34.1–79.7)			
C-reactive protein >15 IU/mL^a				
No (n = 37)	34.7% (13.9–55.5)	0.08	0.04	2.9 (1.1–8.5)
Yes (n = 36)	63.2% (35–91.4)			
Salvage anti-cytokine therapy used	1-year NRM			
Inolimomab (n = 98)	51% (35–67)	0.1	NA	
Etanercept (n = 29)	22% (6–37)			
Overall response rate to salvage therapy^b				
Yes (n = 54)	27% (13–41)	0.01		
No (n = 73)	53% (30–75)			

Abbreviations: 95% CI = 95% confidence interval; Cum.Inc. = cumulative incidence; HR = Hazard ratio; IRM = infection-related mortality; K-M = Kaplan–Meier probability; NA = not applicable. (as analysis of 4-year NRM and its inclusion in the multivariate analysis is not possible owing to the more recent use of etanercept and thus the shorter follow-up in survivors (see Table 1)). Other variables tested in the univariate analyses included: recipient and donor sex, disease phase, Hematopoietic stem cell transplantation Comorbidity Index, EBMT score, Disease-risk Index score, prior SCT, year of SCT, source of stem cells, conditioning regimen, use of TBI, donor type, CMV serostatus, MoAb as first-salvage treatment, overall grade of SR-GvHD, prophylaxis with broad spectrum antifungal, and monocyte, neutrophil and platelet counts at the onset of salvage therapy. All these variables had a P-value > 0.5 in univariate analysis and are thus not included in the table. ^aThese variables refer to their values on the first day of anti-cytokine therapy for SR-GvHD. ^bVariable analyzed as a time-dependent covariate.

impact of year of alloSCT (and of SR-GvHD) on long-term outcomes and found that NRM, IRM and OS were equivalent over time (data not shown). IRM and OS at 4 years were 46% (95% CI 31–61%) and 15% (95% CI 7.7–22%), respectively, as shown in Figures 1 and 2. Acute (56.1%) or chronic (9.5%) GvHD was considered the most common primary cause of death, followed by infections (27.6%). Median time to IRM was 88 days after the diagnosis of SR-GvHD (range: 12–802) with 55% of these deaths occurring in the first 100 days. Bacterial infections were the main cause of IRM (20/29), followed by IFI and pneumonia by a community respiratory virus (4/29 cases each). Disease relapse was the primary cause of death in only 5 cases (3.9%).

Risk factors for IRM

Predictors of IRM are shown in Table 4. In multivariate analysis variables with an impact on IRM were: (i) use of rituximab in the 6 months before alloSCT (HR 4.2; 95% CI 1.1–16.3); (ii) severe

infection prior to the onset of SR-GvHD (HR 5.8; 95% CI 1.3–26.3); and (iii) a serum C-reactive protein >15 IU/mL at the start of salvage treatment (HR 2.9; 95% CI 1.1–8.5).

Late severe infections and IRM in SR-GvHD long-term survivors
Twenty-one patients (17%) were alive and disease-free for >1 year after SR-GvHD onset. Nearly all (90%) developed one or more late severe infection. Two patients with moderate cGvHD developed sepsis caused by encapsulated bacteria and five (24%) had community respiratory virus-associated pneumonia. Five cases of severe HSV or VZV infections were documented.

Eleven of these 21 patients died at a median of 870 days (range, 369–3723) after the onset of SR-GvHD. Chronic GvHD was considered the primary cause of death in 56% of the patients followed by opportunistic infections (26%) and disease relapse (18%).

DISCUSSION

Although opportunistic infections are a well-known cause of morbi-mortality in recipients of an alloSCT, the rates of the different infections and their impact on NRM after SR-GvHD have been scarcely analyzed.^{11–14} In the current study, most severe infections occurred within 100 days from the onset of SR-GvHD, and the 1-year incidence of bacterial, viral and fungal infections was 74%, 65% and 14%, respectively. The incidence of pathogen-defined 4-year IRM was 46%, and bacterial infections were the most common lethal infections. A recent detailed analysis of the infectious complications among 250 alloSCT recipients enrolled in the BMT CTN 0201 trial showed that 79.7% of patients developed at least 1 infection 2 years after SCT. Nevertheless, the 2-year CI of invasive aspergillosis and CMV infection in seropositive recipients were 3.6% and 36.9%, respectively, with infections listed as the primary cause of death in only 5% of patients who died.¹⁵ However, the impact of SR-GvHD was not analyzed in this study.

A significant finding in this study was the high rate (37%) of enterococcal infections, despite the rarity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* cases in our institutions. This is in line with recent studies on the role of the 'pathogenic' intestinal microbiome in patients with active GI GvHD,¹⁶ who suffer a major loss of bacterial diversity with predominant and prolonged persistence of enterococci. There is still no evidence as to whether this overgrowth is involved in the development of GI GvHD or is merely a surrogate marker of disease severity.¹⁷ Nevertheless, these changes, combined with the loss of the protective GI barrier and antibiotic selection explain the high rates of breakthrough enterococcal bloodstream infections.

Unfortunately, the number of events in our study was not high enough to detect the potential poor prognosis associated with enterococcal infections, as reported previously.¹⁸

In terms of viral infection, the rate of BK polyomavirus-hemorrhagic cystitis was high (15%), as expected, in contrast to the low incidence of EBV reactivation.^{19,20} Perhaps surprisingly, the mortality from IFI, CMV disease and other severe viral infections was low, supporting the efficacy of currently available strategies for the prophylaxis, and early diagnosis-based (or pre-emptive) treatments of these life-threatening infections.²¹ Importantly, our data demonstrate that non-*Aspergillus* mold infections remain uncommon in our centers, even in these very high-risk patients.²²

Variables found to significantly worsen the 4-year-IRM included the use of rituximab in the 6 months before SCT, prior severe infection and a baseline serum C-reactive protein level > 15 IU/mL. No other classical risk factors such as disease phase or HCT-CI were associated with IRM, which is probably the consequence of patient heterogeneity and the 15-year study period. In addition, we speculate that, once established, the strongly debilitating effect on the immune system of GvHD and its intensive management minimizes the influence of pre-alloSCT variables, which have a strong predictive impact before SCT.^{23,24}

Prior studies have demonstrated a close relationship between the severity of post-SCT complications and the magnitude of C-reactive protein release, which has been considered an independent prognostic factor.^{25–27} Moreover, we found that a severe infection before SR-GvHD was a significant risk factor for IRM. This finding may simply be related to the fact that host factors which increase the risk of an early severe infection are still relevant a few weeks later during treatment of SR-GvHD. Finally, the observation regarding rituximab is intriguing and deserves further investigation. However, owing to the small sample size, we were not able to evaluate the specific contribution of well-known rituximab side effects such as hypogammaglobulinemia or late-onset neutropenia on the risk of severe infections and IRM.²⁸

An interesting finding was that none of the 11 patients who received sirolimus-based GvHD prophylaxis died from an infection.

In addition, a trend toward a lower IRM was observed in patients rescued with etanercept. However, we would like to emphasize the suggestions made by Martin et al.²⁹ in a 2012 review, who highlight that no valid conclusions can be made regarding the efficacy of salvage therapies for SR-GvHD from retrospective studies. An apparently paradoxical finding is that despite improvements in supportive care over the past 2 decades, the survival of patients with SR-GvHD has not improved over time and IRM is still a major contributing cause of death in this setting. This finding is in line with recently published studies.³⁰

Our study, of course, shares the limitations inherent to all retrospective analyses of complex clinical scenarios, including the inability to assign any specific severe infection(s) as the primary or secondary causes of death in patients with active severe SR-GvHD at the time of this infection. In addition, we were not able to evaluate the impact of the cumulative steroid dose on outcomes, which seems particularly important in this setting.³¹

With a median follow-up for survivors of 10 years, the estimated rate of 1-year and 4-year OS were poor, 24% and 15%, respectively. The introduction of anti-cytokine therapy failed to improve the dismal prognosis of severe SR-GvHD and was associated with a high rate of opportunistic infections. Especially worrisome is the high rate of bacteremia; although barely present in the current patient series, the proportions of multi-drug resistant Gram-negative and Gram-positive bacteria are rising worldwide, and death due to these infections is expected to increase in the near future.³² Patients with SR-GvHD are, of course, the perfect hosts for such life-threatening multi-drug resistant bacterial infections. As the ability to prevent, diagnose and treat the broad range of potential opportunistic infections that may occur is limited, only increasing the response of SR-GvHD with a concomitant improvement of innate and pan-specific immune responses may one day lead to long-term GvHD and severe infection-free survival.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported in part by grants AGAUR 2014SGR-1281, RD12/0036/0071, PI14/00450 and PIE15/00028 from ISCIII, a grant from Cellex Research Foundation, Barcelona, Spain, a grant from Jose Carreras Leukemia Research Institute, and a grant from 'Obra Social La Caixa', Barcelona.

REFERENCES

- Jaglowski Samantha M, Devine Steven M. Graft-versus-host disease: why haven't we made more progress? *Curr Opin Hematol* 2014; **21**: 141–147.
- Martin PJ, Rizzo JD, Wingard JR, Ballen K, Curtin PT, Cutler C et al. First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; **18**: 1150–1163.
- García-Cadenas I, Valcárcel D, Martino R, Piñana JL, Novell S, Esquirol A et al. Updated experience with inolimomab as treatment for corticosteroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013; **19**: 435–439.
- Hsu B, May R, Carrum G, Krance R, Przepiórka D. Use of antithymocyte globulin for treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease: an international practice survey. *Bone Marrow Transplant* 2001; **28**: 945–950.
- Piñana JL, Martino R, Barba P, Margall N, Roig MC, Valcárcel D et al. Cytomegalovirus infection and disease after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation: single-centre experience. *Bone Marrow Transplant* 2010; **45**: 534–542.
- Przepiórka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hovs J et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; **15**: 825–828.
- Cesaro S, Pilon M, Tridello G, Aljurf M, Martino R, Schroyens W et al. Relationship between clinical and BK virological response in patients with late hemorrhagic

- cystitis treated with cidofovir: a retrospective study from the EBMT. *Bone Marrow Transplant* 2013; **48**: 809–813.
- 8 Hirsch HH, Martino R, Ward KN, Boeckh M, Einsele H, Ljungman P. Fourth European Conference on Infections in Leukaemia (ECL-4): guidelines for diagnosis and treatment of human respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, metapneumovirus, rhinovirus, and coronavirus. *Clin Infect Dis* 2013; **56**: 258–266.
 - 9 Engelhard D, Mohty B, de la Camara R, Cordonnier C, Ljungman P. European guidelines for prevention and management of influenza in hematopoietic stem cell transplantation and leukemia patients: summary of ECL-4 (2011), on behalf of ECL, a joint venture of EBMT, EORTC, ICHS, and ELN. *Transpl Infect Dis* 2013; **15**: 219–232.
 - 10 Fine JP, Gray RJ. A proportional hazards model for the sub-distribution of a competing risk. *J Am Stat Assoc* 1999; **94**: 496–509.
 - 11 MacMillan ML, Weisdorf DJ, Davies SM, DeFor TE, Burns LJ, Ramsay NK *et al*. Early antithymocyte globulin therapy improves survival in patients with steroid-resistant acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; **8**: 40–46.
 - 12 Khoury H, Kashyap A, Adkins DR, Brown RA, Miller G, Vij R *et al*. Treatment of steroid-resistant acute graft-versus-host disease with anti-thymocyte globulin. *Bone Marrow Transplant* 2001; **27**: 1059–1064.
 - 13 Kennedy GA, Butler J, Western R, Morton J, Durrant S, Hill GR. Combination antithymocyte globulin and soluble TNFalpha inhibitor (etanercept) +/- mycophenolate mofetil for treatment of steroid refractory acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2006; **37**: 1143–1147.
 - 14 Srinivasan R, Chakrabarti S, Walsh T, Igarashi T, Takahashi Y, Kleiner D *et al*. Improved survival in steroid-refractory acute graft versus host disease after non-myeloablative allogeneic transplantation using a daclizumab-based strategy with comprehensive infection prophylaxis. *Br J Haematol* 2004; **124**: 777–786.
 - 15 Young JA, Logan BR, Wu J, Wingard JR, Weisdorf DJ, Mudrick C *et al*. Infections after transplantation of bone marrow or peripheral blood stem cells from unrelated donors. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016; **22**: 359–370.
 - 16 Holler E, Butzhammer P, Schmid K, Hundsruker C, Koestler J, Peter K *et al*. Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; **20**: 640–645.
 - 17 Dubberke ER, Hollands JM, Georgantopoulos P, Augustin K, DiPersio JF, Mundy LM *et al*. Vancomycin-resistant enterococcal bloodstream infections on a hematopoietic stem cell transplant unit: are the sick getting sicker? *Bone Marrow Transplant* 2006; **38**: 813–819.
 - 18 Vydra J, Shanley RM, George I, Ustun C, Smith AR, Weisdorf DJ *et al*. Enterococcal bacteremia is associated with increased risk of mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2012; **55**: 764–770.
 - 19 Lunde LE, Dasaraju S, Cao Q, Cohn CS, Reding M, Bejanyan N *et al*. Hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic cell transplantation: risk factors, graft source and survival. *Bone Marrow Transplant* 2015; **50**: 1432–1437.
 - 20 García-Cadenas I, Castillo N, Martino R, Barba P, Esquirol A, Novelli S *et al*. Impact of Epstein Barr virus-related complications after high-risk allo-SCT in the era of pre-emptive rituximab. *Bone Marrow Transplant* 2015; **50**: 579–584.
 - 21 Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR), National Marrow Donor Program (NMDP), European Blood and Marrow Transplant Group (EBMT), American Society of Blood and Marrow Transplantation (ASBMT), Canadian Blood and Marrow Transplant Group (CBMTG), Infectious Disease Society of America (IDSA), Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA), Association of Medical Microbiology and Infectious Diseases Canada (AMMI), Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. *Bone Marrow Transplant* 2009; **44**: 453–558.
 - 22 Riches ML, Trifilio S, Chen M, Ahn KW, Langston A, Lazarus HM *et al*. Risk factors and impact of non-Aspergillus mold infections following allogeneic HCT: a CIBMTR infection and immune reconstitution analysis. *Bone Marrow Transplant* 2016; **51**: 322.
 - 23 Barba P, Martino R, Pérez-Simón JA, Fernández-Avilés F, Castillo N, Piñana JL *et al*. Combination of the hematopoietic cell transplantation comorbidity index and the European group for blood and marrow transplantation score allows a better stratification of high-risk patients undergoing reduced-toxicity allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; **20**: 66–72.
 - 24 Barba P, Piñana JL, Martino R, Valcárcel D, Amorós A, Sureda A *et al*. Comparison of two pretransplant predictive models and a flexible HCT-CI using different cut off points to determine low, intermediate-, and high-risk groups: the flexible HCT-CI is the best predictor of NRM and OS in a population of patients undergoing allo-RIC. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; **16**: 413–420.
 - 25 Schots R, Kaufman L, Van Riet L, Lacor P, Trullemans F, De Waele M *et al*. Monitoring of C-reactive protein after allogeneic bone marrow transplantation identifies patients at risk of severe transplant-related complications and mortality. *Bone Marrow Transplant* 1998; **22**: 79–85.
 - 26 Sato M, Nakasone H, Oshima K, Ishihara Y, Wada H, Sakamoto K *et al*. Prediction of transplant-related complications by C-reactive protein levels before hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2013; **48**: 698–702.
 - 27 Lyu YX, Yu XC, Zhu MY. Comparison of the diagnostic value of procalcitonin and C-reactive protein after hematopoietic stem cell transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Transpl Infect Dis* 2013; **15**: 290–299.
 - 28 Ram R, Ben-Bassat I, Shpilberg O, Pollack A, Raanani P. The late adverse events of rituximab therapy-rare but there! *Leuk Lymphoma* 2009; **50**: 1083–1095.
 - 29 Martin P, Inamoto Y, Flowers ME, Carpenter PA. Secondary treatment of acute graft versus host disease: a critical review. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; **18**: 982–988.
 - 30 van Groningen LF, Liefkerink AM, de Haan AF, Schaap NP, Donnelly JP, Blijlevens NM *et al*. Combination therapy with inolimomab and etanercept for severe steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016; **22**: 179–182.
 - 31 Matsumura-Kimoto Y, Inamoto Y, Tajima K, Kawajiri A, Tanaka T, Hirakawa T *et al*. Association of cumulative steroid dose with risk of infection after treatment for severe acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016; **22**: 1102–1107.
 - 32 Mikulska M, Viscoli C, Orasch C, Livemore DM, Averbuch D, Cordonnier C *et al*. Aetiology and resistance in bacteraemias among adult and paediatric haematology and cancer patients. *J Infect* 2014; **68**: 321–331.

7. Discusión

El alo-TPH se asocia a una MRT variable según las características del paciente, el tipo de donante y la intensidad del acondicionamiento, entre otros factores. Los cambios introducidos en los últimos años en relación a la diversidad en la fuente de PH, el grado de compatibilidad donante-receptor, las mejoras del tratamiento de soporte y la menor toxicidad asociada a las pautas de acondicionamiento de intensidad reducida han permitido mejorar los resultados y hacer extensible esta terapia potencialmente curativa a un número cada vez mayor de pacientes. Sin embargo, en el TPH de donante alternativo, la MRT a un año continúa entre el 30-40% en las diferentes series, y alcanza cifras superiores en algunos subgrupos, como es el caso de pacientes con enfermedad activa pre-TPH o aquellos con comorbilidades relevantes.

La MRT se relaciona principalmente con dos aspectos, la aparición de EICR y las complicaciones infecciosas graves que junto a la recaída de la enfermedad de base permanecen como los principales obstáculos para optimizar los resultados del procedimiento. En el ámbito de la EICR, los avances no han sido, ni mucho menos, tan llamativos como en el resto de campos en estudio. La introducción de nuevas estrategias preventivas y agentes inmunodepresores no ha ido de la mano por el momento de una mejora clara en los resultados. Esto se explica por la dificultad para encontrar un balance óptimo que preserve el EICT disminuyendo a cifras muy bajas la aparición de EICRa, especialmente moderada y severa y la EICR crónica extensa. Hasta la fecha, las estrategias eficaces en la disminución de la EICR se han asociado a un aumento importante en los problemas infecciosos, sin mostrar una mejoría final en la supervivencia. De forma inversa, el intento de preservar la EICT se asocia en cambio a la aparición de un número elevado de pacientes con EICR, que si se extiende de forma rápida pese a la instauración de tratamiento corticoideo tiene el mismo pronóstico infausto que hace 30 años.

Por ello, el estudio en profundidad de las complicaciones aloinmunes post-TPH y la identificación de potenciales estrategias de mejora en los distintos ámbitos de actuación son temas de vital importancia. En esta línea, la presente tesis se compone de tres manuscritos que analizan de forma específica distintos aspectos de la profilaxis y el tratamiento de la EICR así como su asociación con la aparición de complicaciones infecciosas graves.

7.1. Sobre el primer trabajo de la Tesis

En el primero de los trabajos que conforman esta Tesis Doctoral se evaluó de forma específica el impacto de los niveles adecuados de inmunodepresión las primeras semanas post-TPH tanto en la aparición de EICRa moderada y severa como en los resultados finales del TPH.

Algunos grupos analizaron previamente esta asociación en receptores de TPH con acondicionamiento mieloablativo, donde se ha demostrado que unos niveles correctos de CsA en sangre durante el periodo peri-injerto pueden modificar de forma clara la incidencia de EICRa grado 2-4 (Izumi et al, 2007; Malard et al, 2010).

En nuestro caso, el ámbito de estudio fue el alo-TIR. Esta particularidad es importante por varios motivos: en primer lugar, por la inexistencia de información específica en este contexto, siendo la mayor parte de análisis en TPH convencional o incluyendo pacientes con plataformas de TPH muy heterogéneas. En segundo lugar, porque ya desde la década de los 90 (Giralt et al, 1997; Slavin et al, 1998) se conoce la especial importancia de un adecuado equilibrio en la inmunodepresión en esta modalidad de TPH, que basa la curación de una forma mucho más marcada en el EICT al reducir la capacidad antitumoral del acondicionamiento. Por último, cabe destacar el importante papel que ha tenido el Hospital de Sant Pau en el avance en el conocimiento, tanto teórico como de optimización del manejo clínico en este escenario, con publicaciones pioneras de muy alto nivel (Martino et al, 2002 y 2006; Valcárcel et al, 2008; Piñana et al, 2010), que han convertido el alo-TIR en una de las principales líneas de investigación de nuestro grupo.

El estudio incluyó un total de 156 pacientes consecutivos receptores de un primer alo-TIR de hermano HLA idéntico. Uno de los puntos fuertes del diseño fue la homogeneidad tanto en la plataforma de TPH (PH de sangre periférica, acondicionamiento basado en Fludarabina y un agente alquilante, profilaxis con CsA como pilar fundamental y ausencia de depleción T) como en la aplicación de un protocolo específico de monitorización y ajuste de la inmunodepresión. Estudios previos de nuestro grupo (Delgado et al, 2009; Piñana et al, 2010) habían mostrado la ausencia de impacto del uso de CsA+MTX vs CsA+ MFM o busulfan vs. melfalan en el desarrollo posterior de EICRa 2-4, por lo que todos los casos se analizaron de forma conjunta.

El primero de los hallazgos del estudio fue que, a pesar de una monitorización intensiva con ajustes frecuentes de dosis, gran parte de los pacientes presentaban niveles de CsA por debajo del rango terapéutico durante el post-TPH precoz.

Únicamente un 15% se encontraban dentro del rango deseado durante la primera semana post-TPH, mientras que en las 3 semanas posteriores entre un 11-17% continuaban con cifras medias de CsA claramente infraterapéuticas.

Entre los posibles factores que explicarían estos datos podría pensarse en el uso de periodos de perfusión cortos del fármaco (aprox. 2 horas) en comparación con las 12-24 h en que se administra en otros centros (Kanda et al, 2006), la monitorización algo menos frecuente, habitualmente bisemanal, en lugar de cada dos días (Martin et al, 2003; Song et al, 2009) y especialmente, en el ajuste de dosis un tanto conservador en aquellos pacientes con concentraciones muy bajas del fármaco por miedo a la aparición de efectos secundarios asociados a su ascenso brusco.

En nuestra serie, y en línea con el estudio de Lanino et al, el inicio de la CsA en el día -7 vs. el -1 no se asoció a diferencias significativas en la concentración sanguínea del fármaco durante la primera semana post-TPH. Sin embargo, teniendo en cuenta el bajo número de pacientes incluidos en ambos grupos y a tenor de que otros trabajos han observado diferencias en los resultados del TPH asociadas al inicio precoz del fármaco (Kedmi et al, 2012) sería de interés profundizar en este aspecto evaluando una serie más amplia de pacientes.

El segundo de los hallazgos del trabajo fue la demostración de que niveles bajos de CsA en la tercera semana post-TPH se asociaban, en el análisis multivariado, a una mayor incidencia de EICRa grado 2-4. En 1988, Yee et al describieron por primera vez la asociación entre los niveles infraterapéuticos de CsA y la aparición de EICRa en la semana posterior. Desde entonces, varios grupos han demostrado que la presencia de niveles subterapéuticos, aunque sólo sea de forma transitoria, tiene un impacto negativo en la incidencia y severidad de la EICRa. Sin embargo, existen discrepancias sobre el periodo en que se considera más relevante el ajuste estricto de los niveles de CsA y especialmente sobre la existencia o no de un impacto directo de la adecuada inmunosupresión en los resultados finales del TPH.

De manera similar a la que muestran otros grupos (Satwani et al, 2005), nuestra serie presenta una incidencia de EICRa moderada y severa del 45% (IC 34-50%) a día +180, con una mediana de aparición de 42 días (rango: 16-185) desde el TPH. La mayor frecuencia de esta complicación en pacientes con concentraciones subóptimas de CsA en sangre durante la tercera semana post-TPH, coincide con el período peri-injerto, que se sitúa entorno al día +15 (rango: 10-29) en nuestra serie.

Datos similares, remarcando la importancia de los inhibidores de calcineurina en la tercera semana post-TPH, han sido reportados por otros grupos, tanto con CsA como con tacrolimus, (Kanda et al, 2006; Mori et al, 2012; Zeighami et al, 2014) que también atribuyen sus resultados a la correlación con el injerto leucocitario y la proliferación y activación posterior de linfocitos del donante, que causa el desarrollo de EICR una semana después. En contraposición, otros grupos describen mayor impacto de los niveles subóptimos de inmunosupresión en la primera semana post-TPH con el desarrollo ulterior de EICRa (Martin et al, 2003; Malard et al, 2010; Ganetsky et al, 2016). En su mayor parte, son análisis en receptores de alo-TPH con acondicionamiento mieloablatoivo en que los hallazgos se explicarían por el papel del mayor daño tisular asociado al tratamiento de acondicionamiento y la importancia de frenar la cascada inflamatoria secundaria en la fase inicial del proceso.

En tercer lugar, nuestro estudio no pudo demostrar un impacto directo de los niveles de CsA en la MRT y la SG, pero sí objetivó unos mejores resultados del TPH a largo plazo en los pacientes que no desarrollaron EICRa 2-4. En nuestra serie, la MRT a un año fue del 20% (IC95%: 15-28) y la SG a uno y 5 años del 67% (IC95%:59-74) y el 45% (IC95%:33-51), respectivamente. En el análisis multivariado, las únicas variables que se asociaron a una mayor MRT y peor SG fueron la enfermedad en fase avanzada al TPH y el desarrollo de EICRa grado 2-4. Los niveles bajos de CsA en la tercera semana post-TPH mostraron cierta tendencia como factor de riesgo independiente en la MRT, pero no alcanzaron la significación estadística ($p=0.06$). Estos resultados son similares a los publicados por la mayor parte de grupos (Wingard et al, 1998; Kanda et al, 2006; Malard et al, 2010) que establecen una relación clara entre la inmunodepresión subóptima y la aparición de EICRa, pero encuentran más dificultades a la hora de demostrar su impacto directo en la SG.

Los beneficios terapéuticos de la CsA están limitados por la aparición de efectos secundarios graves. Una de las complicaciones más serias del fármaco es la nefrotoxicidad. Las formas agudas de esta complicación se caracterizan por la vasoconstricción renal inducida por un desbalance en la liberación de sustancias vasoactivas y radicales de oxígeno que producen un descenso en el filtrado glomerular y vasoconstricción de la arteriola aferente. Estas formas suelen ser reversibles si el fármaco se retira o se ajusta su dosis (Bennett et al, 1983, Piñana et al, 2009). En nuestra serie un tercio de los pacientes presentaron algún grado de fracaso renal agudo (FRA) durante las primeras 5 semanas post-TPH. Estas cifras son similares a las reportadas en estudios previos (Parikh et al, 2004, Kersting et al, 2008). En un 71% de los casos, la CsA se consideró el único agente etiológico responsable. Seis pacientes (3.8%) desarrollaron una MAT.

En el 2009, Piñana et al. publicaron los principales factores de riesgo para el desarrollo de FRA en el ámbito del alo-TIR. Entre ellos se incluían (1) haber recibido más de 3 líneas de quimioterapia pre-TPH, (2) el uso de MTX como profilaxis de EICR, (3) la presencia de EICRa 3-4 y (4) la diabetes mellitus. La relación entre EICR activa y FRA podría relacionarse con el mayor uso de fármacos nefrotóxicos y la deshidratación, aunque otros datos apuntan a un vínculo bidireccional, estando ambas complicaciones íntimamente relacionadas.

Algunos estudios han relacionado los niveles elevados de CsA con el desarrollo posterior de FRA (Kennedy et al, 1985). En nuestra serie, sin embargo, la concentración mediana de CsA en sangre la semana previa no fue diferente en los pacientes con FRA o MAT respecto a los que no presentaron complicaciones de este tipo, incluso en el subgrupo de pacientes con FRA atribuido de forma directa al fármaco. De la misma manera, la incidencia de EICRa 2-4 no fue distinta en los pacientes con FRA respecto a los que no presentaron alteraciones renales. Wingard et al, mostraron datos diferentes en su serie, en la que los pacientes con concentraciones elevadas de CsA presentaban una mayor incidencia de FRA pero un menor riesgo de EICR sin impacto final en los resultados del TPH a largo plazo.

Las principales limitaciones de este estudio incluyen las propias de todo análisis retrospectivo, además del uso de concentraciones medianas de CsA semanales en lugar del ABC como método de análisis. Sin embargo, como ya se ha discutido en apartados previos de este trabajo doctoral, persiste cierta controversia sobre las ventajas e inconvenientes de los distintos métodos de medición (Jin et al, 2008; Duncan et al, 2010). Un aspecto de gran interés que no pudimos analizar en detalle a causa del limitado número de pacientes fue la relación entre los niveles de CsA y las recaídas ulteriores de la enfermedad de base.

El conjunto de resultados obtenidos permiten confirmar el rol central de la inmunodepresión clásica y su adecuado manejo en el ámbito del alo-TIR en nuestra práctica clínica habitual. Teniendo en cuenta la ausencia de una relación clara entre los niveles elevados de CsA y su toxicidad y conociendo la mayor incidencia de EICRa 2-4 (y su asociación con la MRT) en pacientes con niveles infraterapéuticos del fármaco, deben vigilarse las reducciones de dosis en aquellos pacientes con niveles cerca o por encima del límite terapéutico en ausencia de toxicidad. Evitar caídas de la concentración de CsA en sangre en los días posteriores podría traducirse en una mejoría global de los resultados del TPH a largo plazo.

A pesar de los esfuerzos realizados en el campo de la profilaxis de la EICR existe un amplio margen de mejora. Algunas de las posibles nuevas estrategias y líneas de investigación se describen de forma somera al final de este apartado.

7.2. Sobre el segundo trabajo de la Tesis

Una vez demostrada la importancia de una adecuada profilaxis farmacológica en la mejora de los resultados del TPH, y teniendo en cuenta el cada vez más conocido papel de las citoquinas pro-inflamatorias en la fisiopatología de la EICRa, se planteó como siguiente cuestión a investigar la eficacia de uso de los AcMo inhibidores de su producción como tratamiento de aquellos pacientes con formas de afectación moderada y/o grave sin respuesta a esteroides.

En concreto, decidimos ampliar una serie limitada de casos tratados con inolimomab, un inhibidor del receptor de la interleuquina-2, que publicó hace unos años nuestro grupo (Piñana et al, 2006) y modificamos el formato inicial del estudio para incluir el mayor número posible de las recomendaciones recientemente publicadas por Martin et al., centradas en la mejora en la estructura y calidad de los estudios para evaluar tratamientos de segunda línea frente a la EICRa.

A pesar de la persistente limitación que comporta una evaluación retrospectiva de datos, se establecieron criterios claros de inclusión y mínimos de exclusión al permitirse la administración del tratamiento a pacientes con infecciones activas o muy recientes y/o un estado funcional marcadamente deteriorado. El esquema de tratamiento con inolimomab se estableció de forma clara y no se modificó durante todo el periodo de estudio, se describieron los inmunodepresores concomitantes (a excepción de la dosis acumulada de esteroides, dada la ausencia de datos completos) que se consideraron en los análisis de respuesta y supervivencia. A su vez, se siguieron criterios objetivos de valoración de la respuesta al tratamiento, con evaluaciones frecuentes y documentadas de igual manera en todos los casos y se consideró la respuesta global en el día +30 como uno de los indicadores principales del estudio, dada su conocida relación con la MRT (Levine et al, 2010). Las muertes, las recaídas de la enfermedad de base y/o la introducción de nuevos inmunodepresores se consideraron eventos competitivos en el análisis estadístico. Además, se actualizó el seguimiento de los pacientes incluidos en el estudio inicial, con una mediana final de seguimiento de 60 meses en el grupo de supervivientes, y se publicaron datos de supervivencia a 6 meses, 1 y 2 años desde el inicio del tratamiento de rescate.

Globalmente, un 42% de los pacientes del estudio presentó una respuesta inicial a inolimomab, con un 14% de respuestas completas en el día +30. Las cifras fueron mejores en aquellos individuos sin afectación digestiva, en que las respuestas precoces ascendían al 70%. Estos datos son similares a los publicados en el estudio preliminar (50% respuestas globales, con 20% RC) así como en otras series de pacientes con EICR refractaria tratados con AcMo inhibidores de la IL-2 (Hervé et al, 1990; Anasetti et al, 1994).

Tres de los factores asociados a alcanzar algún tipo de respuesta en el día +30 eran esperables: 1) grados 2-3 de afectación global de la EICR, 2) ausencia de linfopenia grave, 3) ausencia de afectación digestiva, que mostró una clara tendencia sin llegar a la significación estadística, probablemente por el limitado tamaño muestral. El cuarto factor, fue el inicio tardío del tratamiento con inolimomab. Este aspecto, que resulta discordante respecto a la información obtenida en el estudio preliminar, en que los pacientes que recibían el tratamiento de rescate en los primeros 15 días desde el diagnóstico de EICR respondían mejor, puede explicarse por un sesgo de selección tiempo-dependiente. Es decir, aquellos individuos que sobreviven un tiempo prolongado desde el inicio de la EICR y estando bajo tratamiento esteroideo a dosis altas son probablemente más fuertes biológicamente y/o tienen una EICR de progresión más lenta y menos agresiva.

El hallazgo fundamental de este segundo trabajo fue la marcada caída en la supervivencia global respecto a los esperanzadores resultados del estudio preliminar. Así como en la publicación del 2006 la SG a un año para la cohorte completa era del 30%, con un 59% de supervivientes a largo plazo en el grupo pacientes respondedores al rescate, ampliar el tamaño muestral de la serie y alargar el seguimiento de los pacientes llevó a una SG a 6, 12 y 24 meses del 34% (IC95%: 24-44), 22% (IC95%: 13-31) y el 18% (IC95%: 10-26), respectivamente. Especialmente llamativos son los hallazgos en el grupo de pacientes con respuesta inicial al inolimomab, que a pesar de ello presentan una SG a 2 años de sólo el 33% (IC95%: 18-48). Estos resultados, son similares o incluso inferiores a los reportados en una revisión reciente (Martin et al, 2012) en la que se incluyen cifras obtenidas de 29 estudios, donde las respuestas globales medianas fueron del 58%, con RC del 32% y SG a 6 meses del 49%. Muy probablemente, nuestros peores resultados estén influenciados por el análisis del papel del fármaco en la práctica asistencial diaria, sin la aplicación de los estrictos criterios de exclusión habitualmente requeridos en los ensayos clínicos, que comportan un más que conocido sesgo de selección y una habitual sobreestimación de la eficacia de los tratamientos evaluados.

En nuestro estudio, igual que en muchas de las publicaciones en este contexto clínico (Hsu et al, 2001; Martin et al, 2012), la principal causa de fracaso del procedimiento fueron los rebotes de la EICR aguda y las infecciones coexistentes. Un 86% de los pacientes de la serie presentaron al menos un episodio de infección grave durante el periodo de seguimiento. En un 65% se documentó al menos una infección bacteriana. Un 59% presentaron una o más reactivaciones del CMV, con 15 casos de afectación orgánica y hubo un 22% de individuos afectados por una IFI. Las muertes atribuibles a infección representaron un 27% del total.

Una de las mayores limitaciones del trabajo fue la ausencia de un grupo control. Se consideró inapropiado utilizar una cohorte histórica incluyendo pacientes tratados con otros agentes de

rescate ya que se han experimentado grandes avances en el tratamiento de soporte en los últimos años, que probablemente contribuyen a la prolongación de la supervivencia inicial de la mayor parte de pacientes y podrían dificultar la interpretación de resultados. Otras limitaciones del trabajo son las propias de los estudios retrospectivos.

El estudio aporta una serie de conclusiones relevantes para la práctica clínica diaria. En primer lugar, y en consonancia con estudios previos, podemos concluir que la SG en los pacientes con EICRa refractaria no ha mejorado en los últimos años. En nuestro caso concreto, inolimomab, no parece aportar ningún beneficio respecto al resto de agentes de rescate. En segundo lugar, parece importante identificar de forma progresiva aquellos factores que permitan predecir la respuesta a los tratamientos disponibles e individualizar así el manejo de cada paciente. Nuestros datos confirman también el importante papel de las infecciones oportunistas en el pronóstico infausto de estos pacientes, lo que abre una nueva línea de investigación de enorme interés. En último lugar, este estudio es un ejemplo de la importancia de la evaluación de los resultados a largo plazo en el terreno de la EICR.

7.3. Sobre el tercer trabajo de la Tesis

Los dos primeros trabajos incluidos en la presente tesis confirman que la presencia de infecciones oportunistas es muy habitual y tiene un impacto deletéreo en los resultados del alo-TPH. En el primero, que incluye una serie homogénea de receptores de alo-TIR, 16 de los 87 pacientes que fallecieron durante el seguimiento (18%) lo hicieron por una infección oportunista. En el segundo, que evaluaba un grupo amplio de pacientes de alto riesgo, con EICRa resistente a esteroides, estas cifras ascendían de forma marcada, y se consideró la infección como evento final en un 27% de los casos. A pesar de que en la mayor parte de estudios evaluando fármacos de rescate para la EICRa las infecciones son siempre descritas como uno de los principales problemas durante el seguimiento de los pacientes, no existen datos específicos en la literatura evaluando su epidemiología, incidencia e impacto en este escenario. Por ello, en el tercer trabajo que conforma esta tesis centramos los esfuerzos en profundizar en este aspecto.

Para reunir el máximo número de pacientes, diseñamos un estudio conjunto con el Servicio de Hematología del Hospital Vall d'Hebrón de Barcelona, centro con el que compartimos estrategias de profilaxis y tratamiento de la EICRa así como métodos de monitorización y manejo de infecciones. Se incluyeron un total de 127 pacientes adultos que recibieron tratamiento con inolimomab o etanercept tras el desarrollo de EICRa grado 2-4 resistente a esteroides.

La IAc a un año de las infecciones más comunes fue: 73.5% (IC95%: 63-83) de infección bacteriana, 67.5% (IC95%: 57-79) de reactivación de CMV y 14% (IC95%: 4-20) de aspergilosis invasiva, que se diagnosticaron de forma prioritaria en los primeros 100 días tras el diagnóstico de EICR refractaria. Otros procesos infecciosos frecuentes fueron la cistitis hemorrágica moderada o grave asociada a poliomavirus BK en un 16% de los pacientes y las reactivaciones de VEB que se documentaron en un 5% de los pacientes monitorizados y muy infrecuentemente derivaron en un SLP-PT asociado al virus.

Un análisis publicado recientemente (Young et al, 2016), analizaba en detalle las complicaciones infecciosas acaecidas en un total de 250 pacientes incluidos en el ensayo clínico BMT CTN 0201. Las infecciones, fueron muy frecuentes en términos generales, con un 79% de los pacientes desarrollando al menos un episodio grave durante los dos primeros años post-TPH. Sin embargo, la IAc de aspergilosis invasiva y reactivación de CMV en individuos seropositivos a 2 años fueron claramente menores que en nuestro estudio, con unas cifras del 3.6% y el 37%, respectivamente. En esta serie las infecciones se consideraron responsables del fallecimiento en sólo un 5% de los pacientes. Sin embargo, el estudio no hace referencia al impacto de la aparición de EICR, especialmente en caso de córtico-refractariedad.

Un aspecto de enorme interés en la actualidad, es la progresiva aparición, en la mayor parte de centros de TPH, de cepas de gérmenes resistentes a antimicrobianos (Mikulska et al, 2014). Este problema, que afecta al conjunto de servicios clínicos de los centros hospitalarios es todavía más relevante en las Unidades de Hematología, dónde existe un número muy elevado de pacientes con necesidad de antibioterapia, en muchos casos empírica y de amplio espectro, durante periodos de tiempo muy prolongados.

En nuestro estudio, los agentes etiológicos más frecuentemente responsables de bacteriemia fueron los estafilococos coagulasa-negativos, que produjeron aproximadamente un tercio de los casos y se asociaron en su mayor parte al catéter venoso central (Frère et al, 2004). Sin embargo, uno de los hallazgos más interesantes del trabajo fue la presencia de 35 casos de bacteriemia por enterococo, 2 de ellos resistentes a Vancomicina. Varios grupos de investigadores centran su trabajo en los últimos años en el estudio del papel del microbioma intestinal en la patogenia de la EICRa digestiva. La mayoría, describen grandes pérdidas de diversidad en la flora intestinal de los pacientes con esta afectación, en los que existe un viraje desde las especies comensales habituales hacia el predominio de enterococos (Holler et al, 2014).

Sin embargo, todavía no existe evidencia suficiente para atribuir a este sobrecrecimiento bacteriano un papel en el desarrollo de EICR y algunos autores indican que podría tratarse únicamente de un marcador surrogado de severidad de la afectación (Dubberke et al, 2006).

En cualquier caso, la combinación de dos aspectos intercurrentes como son la pérdida de la barrera protectora que supone la mucosa digestiva y la presión selectiva de los antibióticos administrados, ya permiten explicar las altas tasas de bacteriemia por enterococo de nuestra serie. Algunos grupos remarcan el mal pronóstico de los pacientes con este subtipo específico de infección (Vydra et al, 2012) desafortunadamente dado el limitado número de casos en nuestra serie, no fue posible hacer un subanálisis detallado al respecto.

La tasa de bacteriemia por gérmenes multi-resistentes fue del 5.7% y el diagnóstico de colitis por *C. difficile*, cuya aparición también parece interrelacionada con la aparición de EICRa, se realizó en menos del 5% de los pacientes. Ambas cifras son claramente inferiores a las descritas por otros grupos (Alonso et al, 2010; Mikulska et al, 2014) y probablemente puedan en parte explicarse por factores ambientales, el cuidadoso uso de antibióticos y la rápida tendencia al descalado de los fármacos de amplio espectro al solventarse las situaciones de gravedad y las estrictas medidas de aislamiento en pacientes colonizados aplicadas en nuestro centro.

Otros cambios destacables en la epidemiología infecciosa de algunos centros se relacionan con la aparición de hongos filamentosos no-*aspergillus* (Riches et al, 2016). El uso de profilaxis generalizada con posaconazol, voriconazol o micafungina explicaría en gran parte este hecho. En nuestra serie sin embargo, a pesar de tratarse de un grupo a priori de muy alto riesgo para IFI y teniendo en cuenta además que hasta un 73% de los pacientes recibieron antifúngicos diferentes al fluconazol en algún momento de la evolución post-TPH, la mayor parte de infecciones (14/16) fueron secundarias a *Aspergillus*, con sólo un caso de mucormicosis y otro de fusariosis.

La MRI fue del 46% a 4 años, siendo las infecciones bacterianas las más letales (20/29). Cabe destacar que, a pesar de la elevada incidencia de reactivaciones de CMV y la presencia de 18 casos de afectación orgánica atribuible al virus, sólo en un paciente ésta fue la causa final de muerte. Este hecho demuestra la importancia de las estrategias de monitorización y tratamiento anticipado o “pre-emptive” que se aplican en la actualidad en la mayor parte de centros, que se han descrito ya en numerosas ocasiones como uno de los factores clave en la mejora de los resultados del TPH (Ullmann et al, 2016). Su utilidad se confirma también en pacientes de elevadísimo riesgo como los incluidos en este trabajo.

Los predictores de MRI fueron: 1) uso de rituximab en los 6 meses previos al alo-TPH, 2) antecedente de infección severa antes del desarrollo de EICR resistente, 3) elevación de la proteína C reactiva (PCR) (>15 UI/ml) al inicio del tratamiento de rescate. Otros factores clásicos habitualmente relacionados con la evolución del TPH como son la edad, las diferencias HLA donante-receptor, la fase de la enfermedad o las comorbilidades no se asociaron con un riesgo aumentado de MRI.

Esto podría explicarse por la marcada heterogeneidad de los pacientes incluidos en la serie, además del prolongado periodo de estudio evaluado (15 años). Sin embargo, podríamos especular también sobre la posibilidad de que el simple desarrollo de una complicación tan compleja y debilitante como la EICR y la subsiguiente inmunodepresión intensa minimicen el papel del resto de variables pre-TPH con potente impacto predictivo en condiciones habituales (Barba et al, 2014).

Varios estudios han mostrado previamente una relación estrecha entre la aparición de complicaciones graves post-TPH y la elevación de la PCR, que se considera un factor de riesgo independiente (Schots et al, 1998; Sato et al, 2013; Lyu et al, 2013). Respecto al papel de los episodios infecciosos previos como factor predictor de MRI, este aspecto podría estar simplemente relacionado con el hecho de que factores de susceptibilidad del huésped que ya comportaban un incremento del riesgo de infección precoz persistan semanas después, una vez instaurado el tratamiento de rescate de la EICR. Respecto al impacto del rituximab en las infecciones post-TPH, algunos estudios han mostrado datos discordantes a los nuestros y reflejan beneficios del AcMo en la reducción de la EICRc y la aparición de SLP-PT asociadas a VEB al administrar el fármaco como parte del acondicionamiento (Khouri et al, 2014; Kennedy et al, 2016). Desafortunadamente, el limitado número de pacientes que recibieron dicho tratamiento en nuestra serie no permitió evaluar la contribución específica de efectos secundarios típicos del fármaco, como la neutropenia de inicio tardío o la hipogammaglobulinemia persistente en el riesgo aumentado de infección grave y MRI (Ram et al, 2009). Otro hallazgo de interés, es el potencial papel del sirolimus, cuando se utiliza como profilaxis anti-EICR, en la reducción de las infecciones graves. Ninguno de los 11 pacientes del estudio que recibieron profilaxis basada en este inhibidor de mTOR fallecieron a causa de una infección. A pesar de que nuevamente hablamos de un número muy pequeño de casos que lógicamente no permite extraer conclusiones firmes, estos datos van en la línea de los observados previamente tanto en nuestro grupo como en receptores de TOS (Ghassemieh et al, 2013; García-Cadenas et al, 2015; Jouve et al, 2016) donde se evidenciaba un impacto beneficioso del sirolimus en la reducción del riesgo de SLP-PT asociado a VEB y otras infecciones de etiología vírica. A su vez, modelos murinos muestran el perfil más inmunomodulador del sirolimus, que preserva los LTreg, inhibiendo de forma específica las células aloreactivas y exhibiendo propiedades antilinfomatosas in vitro (Majewski et al, 2003).

Con el objetivo de confirmar estos interesantes hallazgos, nuestro grupo trabaja en un nuevo proyecto para evaluar el impacto de la profilaxis de EICR (basada en sirolimus vs. otras estrategias) en la incidencia de reactivación y enfermedad por CMV en una serie numerosa de receptores de alo-TIR.

Adicionalmente, nuestro estudio muestra cierta tendencia a un menor riesgo de MRI en los pacientes que recibieron etanercept en lugar de inolimomab como opción de rescate. De nuevo, es preciso confirmar estos datos en nuevos estudios con números mayores de pacientes, idealmente con aleatorización de ambas ramas.

Un aspecto aparentemente paradójico del trabajo es que, a pesar de la conocida mejora del tratamiento de soporte experimentada en las últimas dos décadas, la supervivencia global de los pacientes con EICRa refractaria no mejoró a lo largo del tiempo y la MRI permaneció como una causa mayor de mortalidad en todos los casos. Estos datos van en la misma dirección que los de otras publicaciones recientes (van Groningen et al, 2016).

Finalmente, y a diferencia de otros estudios en pacientes con EICR refractaria, nuestro análisis evidenció infecciones tardías en los supervivientes a largo plazo. Un 17% del total de individuos incluidos en la serie seguían vivos y en RC un año después de iniciado el estudio. Prácticamente todos (90%) desarrollaron una o más infecciones oportunistas posteriormente. La mayor parte de casos fueron sepsis por bacterias encapsuladas y/o infecciones respiratorias por virus adquiridos en la comunidad, que aparecieron en enfermos con EICR crónica moderada o extensa, asplenia funcional y una hipogammaglobulinemia marcada a pesar del tratamiento de soporte. La mitad de los largos supervivientes murieron durante el seguimiento posterior, siendo la EICRc la principal causa de exitus seguida por las infecciones oportunistas, que en este grupo representaron nuevamente entorno al 25% de los fallecimientos.

Los principales puntos débiles del estudio fueron aquellos inherentes a los análisis retrospectivos de escenarios clínicos complejos, en los que en ocasiones no es fácil asignar la causa principal de muerte a una infección específica o bien decidir que la infección es una causa secundaria, en el contexto de la EICR activa. Además, por falta de datos completos, no pudimos analizar el impacto de las dosis acumuladas de esteroides en los resultados a largo plazo de estos pacientes, cuestión de enorme interés en este contexto clínico (Matsumura-Kimoto et al, 2016).

Nuestro estudio es, según nos consta, el primero en analizar de forma específica el impacto de las infecciones graves en la MRT en pacientes con EICR refractaria. Esta limitada experiencia muestra la ausencia de cambios en el infausto pronóstico de este grupo de pacientes, donde el uso de AcMo inhibidores de las citoquinas inflamatorias no parece mejorar los resultados a largo plazo y se asocia a unas tasas muy llamativas de infección grave. Especialmente preocupante es la elevada tasa de bacteriemias, con un más que probable incremento en las infecciones por gérmenes multi-resistentes en un futuro cercano, al ser los pacientes con EICR resistente el hésped perfecto para este tipo de patógenos.

Probablemente la profilaxis antimicrobiana instaurada condiciona en gran medida la incidencia de infección y su optimización permita reducir la mortalidad infecciosa. Para ello, son necesarios más estudios analizando las mejores estrategias de prevención y monitorización en estos pacientes.

Algunos grupos apuntan que los abordajes coordinando tres factores principales: 1) uso de fármacos inmunoreguladores como tratamiento de rescate, 2) monitorización y manejo intensivo de infecciones y 3) retirada rápida de los esteroides a pesar de la persistencia de actividad de la EICR; son los más prometedores (Srinivasan et al, 2004).

A tenor de la esperable limitada capacidad para prevenir, diagnosticar y tratar el amplio abanico de infecciones oportunistas graves que se avecinan, las mejoras en la MRT dependerán probablemente de la obtención de mejores y más prolongadas respuestas al tratamiento de la EICR y de la implementación de estrategias de terapia celular adoptiva concomitantes que mejoren la respuesta inmune tanto innata como pan-específica, permitiendo así la supervivencia libre de EICR e infecciones. Se genera, por tanto un nuevo paradigma en el manejo de la EICR grave que balancea la intensidad del tratamiento inmunodepresor instaurado con la implementación de medidas anti-infecciosas individualizadas.

7.4. Próximos pasos

Como ya hemos visto, los trabajos que conforman esta Tesis Doctoral tratan diversos aspectos con gran impacto en la morbi-mortalidad post alo-TPH, con especial hincapié en la EICRa grave, y conforman el esqueleto de una línea de investigación que esperamos continuar en los próximos años.

Los siguientes pasos para mejorar los resultados finales del procedimiento pueden desglosarse de nuevo en estas tres áreas de estudio:

1. Profilaxis de la EICR
 - a. Generación de modelos combinados que tengan en cuenta el balance entre el riesgo de recaída de la enfermedad de base y la aparición de EICR (estudio de polimorfismos genéticos y discrepancias KIR en donante y receptor), además de las comorbilidades, para individualizar así los inmunodepresores a usar y el rango terapéutico óptimo para cada paciente y en cada fase del TPH.
 - b. Posibilidad de estudios de genotipado para un mejor ajuste de las dosis iniciales de inmunodepresores.
 - c. Papel de la Ciclofosfamida post-TPH en el trasplante de donante emparentado y no emparentado HLA idéntico.
 - d. Introducción de nuevos agentes con mecanismos de acción diferentes: moléculas coestimuladoras, estabilizadores del endotelio y otros.
 - e. Papel de la microbiota en la EICR digestiva. Restricción de antibióticos de amplio espectro, estudio de portadores de cepas resistentes y técnicas de regeneración de la flora comensal.

2. Tratamiento de la EICR
 - a. Estudio de paneles de biomarcadores (proteómica) para el diagnóstico precoz de la EICR o predicción de respuesta subóptima al tratamiento inicial (analítica convencional: PCR, albúmina, plaquetas, linfocitos totales y subpoblaciones linfocitarias, marcadores específicos de tejido: ej. Elafina, REG α ...)
 - b. Estudio de fisiopatología de la córtico-resistencia asociada a EICR.
 - c. Intensificación del tratamiento de primera línea y descenso rápido de esteroides en pacientes con alto riesgo de refractariedad.
 - d. Ensayos clínicos de evaluación de nuevos fármacos con mecanismo de acción diferente y efecto mantenido en el tratamiento de rescate.
 - e. Análisis detallado del impacto de la EICR en la calidad de vida de los pacientes.

3. Infecciones oportunistas

- a. Estudio de portadores de bacterias multi-resistentes, estrategias de prevención o predicción de aparición y análisis de la utilidad del tratamiento anticipado dirigido con antibióticos activos en pacientes colonizados.
- b. Estudios continuados evaluando la eficacia y seguridad de la profilaxis prolongada (>30 días y >100 días) con antifúngicos de amplio espectro, especialmente en las fases iniciales, en que se administran dosis altas de corticoides.
- c. Evaluación del papel de la monitorización y tratamiento anticipado de adenovirus, poliomavirus BK y/o VHH-6, además del CMV y el VEB, hasta la normalización de las cifras de linfocitos T.
- d. Mejoría de la reconstitución inmune específica mediante estrategias de terapia celular adoptiva (LT poliespecíficos, LT anti-CMV, CAR T cells anti-aspergillus...).
- e. Combinación del estudio de la carga vírica en sangre mediante PCR y el análisis de la reconstitución inmune general y específica (subpoblaciones linfoides, cuantiferon CMV...) para la instauración y evaluación de la eficacia de medidas de terapia celular adoptiva anti-infecciosa.

8. Conclusiones

Trabajo número 1: Profilaxis de la EICR

A pesar del uso de protocolos de monitorización estrecha con ajustes frecuentes de dosis, un número importante de receptores de alo-TIR de hermano HLA idéntico presenta niveles de inmunodepresores infraterapéuticos durante el post-TPH precoz. Las concentraciones bajas de CsA en sangre durante el periodo peri-injerto se asocian a una mayor incidencia de EICRa grado 2-4. La fase avanzada de la enfermedad al TPH y el desarrollo de EICRa grado 2-4 se relacionan con una mayor MRT y menor SG en este habitual escenario clínico.

Trabajo número 2: Tratamiento de la EICRa refractaria

La administración de inolimomab como tratamiento de rescate en pacientes con formas moderadas/severas de EICRa córtico-resistente se asocia a una supervivencia a largo plazo de sólo el 18% a pesar de que casi un 50% de los pacientes presenta respuestas iniciales al fármaco. En los estudios evaluando tratamientos de segunda línea en este escenario, tanto el análisis de números pequeños de pacientes como la evaluación prematura de resultados pueden llevar a una sobreestimación de la eficacia real de las nuevas estrategias terapéuticas.

Trabajo número 3: Infecciosas oportunistas y EICR

Las complicaciones infecciosas son muy habituales en los pacientes con EICRa refractaria y representan el 27% de los fallecimientos. Especial interés merecen la elevada incidencia de bacteriemias por enterococo así como las cifras no desdeñables de infección por gérmenes múltiresistentes y colitis por C.difficile. El uso de rituximab en los 6 meses previos al TPH, el antecedente de infección grave y una PCR elevada al inicio del tratamiento de rescate se asocian a una mayor MRI. De igual manera, un tercio de los largos supervivientes desarrollan infecciones tardías con impacto deletéreo, generalmente asociadas al desarrollo posterior de EICR crónica.

9. Referencias bibliográficas

1. Al-Homsi AS, Cole K, Bogema M et al. Short Course of Post-Transplantation Cyclophosphamide and Bortezomib for Graft-versus-Host Disease Prevention after Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation Is Feasible and Yields Favorable Results: A Phase I Study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21:1315-1320.
2. Ali AM, DiPersio JF, Schroeder MA. A proposed biology- and biomarker-based algorithm for management of acute GvHD. *Bone Marrow Transplant.* 2017;52:337-340.
3. Alonso CD, Treadway SB, Hanna DB et al. Epidemiology and outcomes of *Clostridium difficile* infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2012 ;54:1053-1063.
4. Alousi AM, Weisdorf DJ, Logan BR, et al. Etanercept, mycophenolate, denileukin, or pentostatin plus corticosteroids for acute graft-versus-host disease: a randomized phase 2 trial from the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. *Blood.* 2009;114:511-517.
5. Anasetti C, Hansen JA, Waldmann TA, et al. Treatment of acute graft-versus-host disease with humanized anti-Tac: an antibody that binds to the interleukin-2 receptor. *Blood.* 1994;84:1320-1327.
6. Arai S, Margolis J, Zahurak M, Anders V, Vogelsang GB. Poor outcome in steroid-refractory graft-versus-host disease with antithymocyte globulin treatment. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8:155-160.
7. Bacigalupo A, Moretta L. T-cell-mediated suppression of hemopoiesis. *Immunol Today.* 1981 ;2:47-48.
8. Bacigalupo A, Sormani MP, Lamparelli T et al. Reducing transplant related mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica,* 2004. 89: 1238-1247.
9. Ballen K. New trends in umbilical cord blood transplantation. *Blood.* 2005;105:3786-3792.
10. Barba P, Martino R, Pérez-Simón JA, et al. Combination of the Hematopoietic Cell Transplantation Comorbidity Index and the European Group for Blood and Marrow Transplantation score allows a better stratification of high-risk patients undergoing reduced-toxicity allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 ;20:66-72.
11. Barker JN, Wagner JE. Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:526–532.

12. Barkholt L, Remberger M, Bodegard H et al. Cyclosporine A (CsA) 2-h concentrations vary between patients without correlation to graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 683–689.
13. Barnes DW, Loutit JF. Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. *Br J Haematol.* 1957; 3: 241-252.
14. Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet.* 2009;373:1905-1917.
15. Barrett AJ, Kendra JR, Lucas CF, et al. Cyclosporin A as prophylaxis against graft-versus-host disease in 36 patients. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1982;17;285:162-166.
16. Beelen DW, Haralambie E, Brandt H, et al. Evidence that sustained growth suppression of intestinal anaerobic bacteria reduces the risk of acute graft-versus-host disease after sibling marrow transplantation.. *Blood.* 1992; 15;80:2668-2676.
17. Benito AI, Furlong T, Martin PJ, et al. Sirolimus (rapamycin) for the treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplantation.* 2001;72:1924-1929.
18. Bennett W and Pulliam J. Cyclosporine nephrotoxicity. *Ann Intern Med.* 1983;99:851-854.
19. Berenbaum MC, Brown IN. Prolongation of homograft survival in mice with single doses of Cyclophosphamide. *Nature.* 1963;5;200:84.
20. Bertz H, Afting M, Kreisel W, Duffner U, Greinwald R, Finke J. Feasibility and response to budesonide as topical corticosteroid therapy for acute intestinal GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 1999;24:1185–1189.
21. Bertz H, Drognitz K, Finke J. Analysis of the efficiency and costs of antifungal prophylaxis and mycological diagnostics in patients undergoing allogeneic haematopoietic cell transplantation: "real life" evaluation. *Ann Hematol.* 2016;95:457-463.
22. Bhutani D, Dyson G, Manasa R et al. Incidence, risk factors, and outcome of cytomegalovirus viremia and gastroenteritis in patients with gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21:159-164.
23. Bilinski J, Robak K, Peric Z et al. Impact of gut colonization by antibiotic resistant bacteria on the outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective, single center study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016; 22: 1087-1093.
24. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect.* 1966-1967; 62: 21-78.
25. Binkert L, Medinger M, Halter JP et al. Lower dose anti-thymocyte globulin for GvHD prophylaxis results in improved survival after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2015;50:1331-1336.

26. Blazar BR, Murphy WJ and Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol.* 2012;11;12:443-458.
27. Bleakley M, Riddell SR. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:371-380.
28. Blennow O, Remberger M, Törlén J, et al Risk Factors for Invasive Mold Infections and Implications for Choice of Prophylaxis after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22:1684-1689.
29. Bolanos-Melade J, Jacobsohn DA, Margolis J, et al. Pentostatin in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *J Clin Oncol.* 2005;23:2661-2668.
30. Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, et al. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science.* 1997;13;276:1719-1724.
31. Bordigoni P, Dimicoli S, Clement L, et al. Daclizumab, an efficient treatment for steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol.* 2006;135:382-385.
32. Bow EJ, Vanness DJ, Slavin M, et al. Systematic review and mixed treatment comparison meta-analysis of randomized clinical trials of primary oral antifungal prophylaxis in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *BMC Infect Dis.* 2015; 17;15:128.
33. Briones J, Novelli S, and Sierra J. T-Cell Costimulatory Molecules in Acute-Graft-Versus Host Disease: Therapeutic Implications. *EURASIP Journal on Bone Marrow Research.* 2011;2011:976793.
34. Busca A, Locatelli F, Marmont F et al. Recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor fusion protein as treatment for steroid refractory graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol.* 2007;82:45-52.
35. Cainelli F, Vento S. Infections and solid organ transplant rejection: a cause-and-effect relationship? *Lancet Infect Dis.* 2002; 2:539-549.
36. Carella AM, Beltrami G, Scalzulli PR, et al. Alemtuzumab can successfully treat steroid refractory acute graft-versus-host disease (aGVHD). *Bone Marrow Transplant.* 2004;33:131-132.
37. Castagnola E, Bagnasco F, Bandettini R, et al. Role of acute graft-versus-host disease in the risk of bacteremia and invasive fungal disease after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation in children. Results from a single-center observational study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20:1068-1073.
38. Chang YJ, Xu LP, Wang Y, et al. Controlled, Randomized, Open-Label Trial of Risk-Stratified Corticosteroid Prevention of Acute Graft-Versus-Host Disease After Haploidentical Transplantation. *J Clin Oncol.* 2016;1;34:1855-1863.

39. Chakrabarti S, Mackinnon S, Chopra R, et al. High incidence of cytomegalovirus infection after nonmyeloablative stem cell transplantation: potential role of Campath-1H in delaying immune reconstitution. *Blood*. 2002;99:4357–4363.
40. Chemaly RF, Shah DP, Boeckh MJ. Management of respiratory viral infections in hematopoietic cell transplant recipients and patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis*. 2014; 15;59 Suppl 5:S344-351.
41. Chien JW, Zhang XC, Fan W et al. Evaluation of published single nucleotide polymorphisms associated with acute GVHD. *Blood*. 2012; 31;119:5311-319.
42. Chikanza IC, Kozaci DL. Corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: molecular and cellular perspectives. *Rheumatology (Oxford)*. 2004;43:1337-1345.
43. Choi SW, Braun T, Chang L et al. Vorinostat plus tacrolimus and mycophenolate to prevent graft-versus-host disease after related-donor reduced-intensity conditioning allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: a phase 1/2 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15:87-95.
44. Cooney GF, Habucky K and Hoppu K. Cyclosporine pharmacokinetics in pediatric transplant recipients. *Clin Pharmacol*. 1997; 32: 481-495.
45. Couriel D, Saliba R, Hicks K, et al. Tumor necrosis factor- α blockade for the treatment of acute GVHD. *Blood*. 2004;104: 649-654.
46. Curtis RE, Travis LB, Rowlings PA, et al. Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multiinstitutional study. *Blood*. 1999;94:2208-2216.
47. Deeg J. How I treat refractory acute GVHD. *Blood*. 2007; 15; 109: 4119–4126.
48. Delgado J, Marco A, Moreno E et al. Reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation using oral fludarabine as part of the conditioning regiment. *Cytotherapy*. 2009;11:356-361.
49. den Haan JM, Sherman NE, Blokland E. Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science*. 1995; 268:1476-1480.
50. Dini G, Lamparelli T, Rondelli R, et al. Unrelated donor marrow transplantation for chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*. 1998;102:544-552.
51. Dokheler MC, Wiels J, Lipinski M, et al. Natural killer cell activity in human bone marrow recipients: early reappearance of peripheral natural killer activity in graft-versus-host disease. *Transplantation*. 1981;31:61-65.
52. Doubrovina E, Carpenter T, Pankov D. Mapping of novel peptides of WT-1 and presenting HLA alleles that induce epitope-specific HLA-restricted T cells with cytotoxic activity against WT-1 (+) leukemias. *Blood*. 2012; 120: 1633-46.
53. Dubberke ER, Hollands JM, Georgantopoulos P, Augustin K, DiPersio JF, Mundy LM et al. Vancomycin-resistant enterococcal bloodstream infections on a hematopoietic

- stem cell transplant unit: are the sick getting sicker? *Bone Marrow Transplant*. 2006;38:813-819.
54. Dugan MJ, DeFor TE, Steinbuch M, et al. ATG plus corticosteroid therapy for acute graft versus- host disease: predictors of response and survival. *Ann Hematol*. 1997;75:41-46.
 55. Duncan N, Craddock C. Optimizing the use of cyclosporin in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006;38:169-174.
 56. Duncan N, Arrazi J, Nagra S, et al. Prediction of intravenous cyclosporine area under the concentration-time curve after allogeneic stem cell transplantation. *Ther Drug Monit*. 2010 ;32:353-8.
 57. Farrell RJ, Kelleher D. Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. *J Endocrinol*. 2003;178:339-346.
 58. Fefer A, Sullivan KM, Weiden P et al. Graft versus leukemia effect in man: the relapse rate of acute leukemia is lower after allogeneic than after syngeneic marrow transplantation. *Prog Clin Biol Res*. 1987; 244: 401-408.
 59. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009; 373: 1550-1561.
 60. Filipovich AH, Weisdorf D et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11:945-956.
 61. Flowers ME, Inamoto Y, Carpenter PA, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood*. 2011; 17;117:3214-3219.
 62. Frère P, Hermanne JP, Debouge MH, et al. Bacteremia after hematopoietic stem cell transplantation: incidence and predictive value of surveillance cultures. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33:745-749.
 63. Fuji S, Kapp M, Einsele H. Alloreactivity of virus-specific T cells: possible implication of graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effects. *Front Immunol*.2013; 4:330.
 64. Furlong T, Storb R, Anasetti C, et al. Clinical outcome after conversion to FK 506 (tacrolimus) therapy for acute graft-versus-host disease resistant to cyclosporine or for cyclosporine-associated toxicities. *Bone Marrow Transplant*. 2000;26:985–991.
 65. Furlong T, Leisenring W, Storb R, et al. Psoralen and ultraviolet A irradiation (PUVA) as therapy for steroid-resistant cutaneous acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8:206–212.
 66. Furlong T, Martin P, Flowers ME, et al. Therapy with mycophenolate mofetil for refractory acute and chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44:739-748.

67. Gandhi MK, Wills MR, Sissons JG et al. Human cytomegalovirus-specific immunity following haemopoietic stem cell transplantation. *Blood Rev.* 2003;17(4):259-264.
68. Ganetsky A, Shah A, Miano TA, et al. Higher tacrolimus concentrations early after transplant reduce the risk of acute GvHD in reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51:568-572.
69. García-Cadenas I, Castillo N, Martino R, Barba P, Esquirol A, Novelli S et al. Impact of Epstein Barr virus-related complications after high-risk allo-SCT in the era of pre-emptive rituximab. *Bone Marrow Transplant.* 2015;50:579-584.
70. Gerbitz A , Schultz M , Wilke A , et al. Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease : let them eat yogurt. *Blood.*2004;103:4365–4367.
71. Ghalie R, Fitzsimmons WE, Weinstein A et al. Cyclosporine monitoring improves graft-versus-host disease prophylaxis after bone marrow transplantation. *Ann Pharmacother* 1994; 28: 379–383.
72. Ghassemieh B, Ahya VN, Baz MA, et al. Decreased incidence of cytomegalovirus infection with sirolimus in a post hoc randomized, multicenter study in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2013;32:701-706.
73. Ghez D, Rubio MT, Maillard N, et al. Rapamycin for refractory acute graft-versus-host disease. *Transplantation.* 2009;88:1081-1087.
74. Girmenia C, Rossolini GM, Piciocchi A, et al. Infections by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in SCT recipients: a nationwide retrospective survey from Italy. *Bone Marrow Transplant.* 2015; 50: 282-288.
75. 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.
76. Gluckman E, Lokiec F, Devergie A. Pharmacokinetic monitoring of cyclosporine in allogeneic bone marrow transplants. *Transplant Proc* 1985; 17: 500–501.
77. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation.* 1974; 18: 295-304.
78. Gomez-Almaguer D, Ruiz-Arguelles GJ, del Carmen Tarin- Arzaga L, et al. Alemtuzumab for the treatment of steroidrefractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14:10-15.
79. Gooley TA, Chien JW, Pergam Sa. Reduced mortality after allogeneic cell transplantation. *N Engl J Med.* 2010; 363:2091-2101.

80. Goodyear, O. C. et al. Azacitidine augments expansion of regulatory T cells after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012. 119, 3361–3369
81. Gowans JL. Cellular mediators of allograft immunity. *Transplant Proc*. 1977;9:685-690.
82. Grant D, Kneteman N, Tchervenkov J, et al. Peak cyclosporine levels (Cmax) correlate with freedom from liver graft rejection: results of a prospective, randomized comparison of neoral and sandimmune for liver transplantation (NOF-8). *Transplantation*. 1999;67:1133-1137.
83. Greenblatt MB1, Vrbanac V, Tivey T, et al. Graft versus host disease in the bone marrow, liver and thymus humanized mouse model. *PLoS One*. 2012;7:e44664.
84. Grevel J, Welsh MS, Kahan BD. Cyclosporine monitoring in renal transplantation: Area under the curve monitoring is superior to trough-level monitoring. *Ther Drug Monit* 1989;11:246–248.
85. Greinix HT, Volc-Platzer B, Kalhs P, et al. Extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a pilot study. *Blood*. 2000;96:2426-2431.
86. Hamidieh AA, Hadjibabaie M, Ghehi MT, et al. Long-term follow-up of children treated with daclizumab for steroid-refractory gastrointestinal GvHD in a prospective study. *Pediatr Transplant*. 2012;16:664-669.
87. Hervé P, Wijdenes J, Bergerat JP, et al. Treatment of corticosteroid resistant acute graft-versus-host disease by in vivo administration of anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody (B-B10). *Blood*. 1990;75(4):1017-1023.
88. Hew M, Bhavsar P, Torrego A, et al. Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:134-141.
89. Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2000; 95: 2754-2759.
90. Hings IM, Filipovich AH, Miller WJ, et al. Prednisone therapy for acute graft-versus-host disease: short- versus long-term treatment. A prospective randomized trial. *Transplantation*. 1993; 56:577–580.
91. Hiraoka A, Ohashi Y, Okamoto S et al. Phase III study comparing tacrolimus (FK506) with cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 181–185.
92. Ho VT, Zahrieh D, Hochberg E, et al. Safety and efficacy of denileukin diftitox in patients with steroid-refractory acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2004;104:1224-1226.

93. Hockenbery DM, Cruickshank S, Rodell TC, et al. A randomized, placebo-controlled trial of oral beclomethasone dipropionate as a prednisone-sparing therapy for gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood*. 2007;109:4557-4563.
94. Hoda D, Pidala J, Salgado-Vila N, et al. Sirolimus for treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2009;72:1924-1929.
95. Holler E, Butzhammer P, Schmid K, et al. Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014; 20:640–645.
96. Holtan SG, Pasquini M, Weisdorf DJ. Acute graft-versus-host disease: a bench-to-bedside update. *Blood*. 2014;124:363-73.
97. Hsu B, May R, Carrum G, et al. Use of antithymocyte globulin for treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease: an international practice survey. *Bone Marrow Transplant*. 2001;28:945-950.
98. Inrona M, Rambaldi A. Mesenchymal stromal cells for prevention and treatment of graft-versus-host disease: successes and hurdles. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20:72-78.
99. Izumi N, Furukawa T, Sato N et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: retrospective analysis of 73 patients who received cyclosporin A. *Bone Marrow Transplantation*. 2007;40:875-80.
100. Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Robson MJ, Bethard WF, Gaston EO. The role of the spleen in radiation injury and recovery. *J Lab Clin Med*. 1949;35:746-770.
101. Jenq R, Ubeda C, Taur Y, et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med*. 2012;209:903–911.
102. Jenq R, Marcel RM. Identification of intestinal commensal bacteria protective against GVHD in mice and humans. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20: S22–23.
103. Jin M, Seto W, Taylor T et al. Determination of initial i.v. CYA dosage to achieve target AUC values in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients. *Bone Marrow Transplantation*. 2008; 42, 455–459.
104. Jones BS, Lamb LS, Goldman F, et al. Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer. *Front Pharmacol*. 2014;27;5:254.
105. Jouve T, Rostaing L, Malvezzi P. Place of mTOR inhibitors in management of BKV infection after kidney transplantation. *J Nephrol*. 2016;5:1-7.

106. Kanda Y, Hyo R, Yamashita T et al. Effect of blood cyclosporine concentration on the outcome of hematopoietic stem cell transplantation from an HLA-matched sibling donor, *American Journal of Hematology*. 2006;81:838-844.
107. Kakihana K. Fecal microbiota transplantation for patients with steroid-resistant acute graft-versus-host disease of the gut. *Blood*. 2016; 128: 2083–2088.
108. Kanda Y, Kobayashi T, Mori T et al. A randomized controlled trial of cyclosporine and tacrolimus with strict control of blood concentrations after unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2016;51:103-109.
109. Kharfan-Dabaja M, Mhaskar R, Reljic T. Mycophenolate mofetil versus methotrexate for prevention of graft-versus-host disease in people receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;7:CD010280.
110. Kedmi M, Dray L, Grisariu S, et al. The effect of cyclosporine initiation time on the outcome of matched allogeneic stem-cell transplantation following fludarabine-based conditioning. *Transpl Int*. 2012;25:1241-1247.
111. Kennedy MS, Yee GC, McGuire TR, et al. Correlation of serum cyclosporine concentration with renal dysfunction in marrow transplant recipients. *Transplantation*. 1985;40:249-253.
112. Kennedy GA, Butler J, Western R, et al. Combination antithymocyte globulin and soluble TNF α inhibitor (etanercept) +/- mycophenolate mofetil for treatment of steroid refractory acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2006; 37:1143–1147.
113. Kennedy VE, Savani BN, Greer JP, et al. Reduced Intensity Conditioning with Fludarabine, Cyclophosphamide, and Rituximab is Associated with Improved Outcomes Compared to Fludarabine and Busulfan Following Allogeneic Stem Cell Transplantation for B-Cell Malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22:1801-1807.
114. Kersting S, Dorp S, Theobal M et al. Acute renal failure after nonmyeloablative stem cell transplantation in adults. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14:125-131.
115. Khandelwal P, Fukuda T, Mizuno K, et al. A Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Maraviroc as Acute Graft-versus-Host Disease Prophylaxis in Pediatric Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients with Nonmalignant Diagnoses. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 ;22:1829-1835.
116. Khouri IF, Wei W, Korbling M, et al. BFR (bendamustine, fludarabine, and rituximab) allogeneic conditioning for chronic lymphocytic leukemia/lymphoma: reduced myelosuppression and GVHD. *Blood*. 2014;124:2306-2312.

117. Kim JG, Sohn SK, Kim DH, et al. Different efficacy of mycophenolate mofetil as salvage treatment for acute and chronic GVHD after allogeneic stem cell transplant. *Eur J Haematol.* 2004;73:56-61.
118. Kim SB, Min YH, Cheong JW, et al. Incidence and risk factors for carbapenem- and multidrug resistant- *Acinetobacter baumannii* bacteremia in hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Scand J Infect Dis.* 2014; 46: 81-88.
119. Kim N, Jeon YW, Nam YS, et al. Therapeutic potential of low-dose IL-2 in a chronic GVHD patient by in vivo expansion of regulatory T cells. *Cytokine.* 2016;78:22-26.
120. Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood.* 1995;86: 2041-2050.
121. Koreth, J. Stevenson KE, Kim HT, et al. Bortezomib, tacrolimus, and methotrexate for prophylaxis of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation from HLA-mismatched unrelated donors. *Blood.* 2009;114:3956-3959.
122. Kröger N, Solano C, Wolschke C et al. Antilymphocyte Globulin for prevention of Chronic graft versus host disease. *NEJM* 2016; 374: 43-53.
123. Kroschinsky F, Wichmann G, Bornhauser M, et al. Efficacy and tolerability of prophylactic treatment with intravenous piperacillin/tazobactam in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis.*2002;4.3:132-136.
124. Labrador J, López-Corral L, López-Godino O et al. Risk factors for thrombotic microangiopathy in allogeneic hematopoietic stem cell recipients receiving GVHD prophylaxis with tacrolimus plus MTX or sirolimus. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49:684-690.
125. Ladas EJ, Bhatia M, Chen L. The safety and feasibility of probiotics in children and adolescents undergoing hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51:262-266.
126. Lamparelli T, Van Lint MT, Gualandi F, et al. Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia (CML) from unrelated and sibling donors: single center experience. *Bone Marrow Transplant.* 1997;20:1057-1062.
127. Lanino E, Rondelli R, Locatelli F et al. Early (day -7) versus conventional (day -1) inception of cyclosporine-A for graft-versus- host disease prophylaxis after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation in children. Long-term results of an AIEOP prospective, randomized study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15:741-748.

128. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004;363:1439–1441.
129. Lenarsky, C. Immune recovery after bone marrow transplantation. *Curr Opin Hematol* 1995;2:409–412.
130. Lenneke FJ, Aleida M, Anton FJ et al. Combination therapy with inolimomab and etanercept for severe steroid-refractory acute graft versus host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*.2016;22:179-182.
131. Levine JE, Logan B, Wu J, et al. Graft-versus-host disease treatment: Predictors of survival. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010; 16:1693–1699.
132. Levine J, Paczesny S, Sarantopoulos S. Clinical Applications for Biomarkers of Acute and Chronic Graft vs. Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012 ; 18: S116–S124.
133. Levine JE, Logan BR, Wu J, et al. Acute graft-versus-host disease biomarkers measured during therapy can predict treatment outcomes: a Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network study. *Blood*. 2012;119:3854-3860.
134. Lili L, Wang J, Zhang W, et al. Risk factors for invasive mold infections following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single center study of 190 recipients. *Scand J Infect*. 2012;44:100-107.
135. Ljungman P, Perez-Bercoff L, Jonsson J, et al. Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2006;91:78–83.
136. Loiseau P, Busson M, Balere ML, et al. HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:965–974.
137. Lunde LE, Dasaraju S, Cao Q, Cohn CS, Reding M, Bejanyan N et al. Hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic cell transplantation: risk factors, graft source and survival. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50:1432-1437.
138. Lyu YX, Yu XC, Zhu MY. Comparison of the diagnostic value of procalcitonin and C-reactive protein after hematopoietic stem cell transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Transpl Infect Dis*. 2013;15:290-299.
139. Machishima T, Kako S, Wada H et al. The safety and efficacy of acute graft-versus-host disease prophylaxis with a higher target blood concentration of cyclosporine around 500 ng/mL. *Clin Transplant*. 2013;27:749-756.

140. MacMillan ML, Weisdorf DJ, Davies SM, et al. Early antithymocyte globulin therapy improves survival in patients with steroid-resistant acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8:40–46.
141. Majewski M, Korecka M, Joergensen J. Immunosuppressive TOR kinase inhibitor everolimus (RAD) suppresses growth of cells derived from posttransplant lymphoproliferative disorder at allograft-protecting doses. *Transplantation.* 2003;75:1710-1717.
142. Malard F, Szydlo M, Brissot E et al. Impact of cyclosporine-A concentration on the incidence of severe acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16:28-34.
143. Manzo VE, Bhatt AS. The human microbiome in hematopoiesis and hematologic disorders. *Blood.* 2015 Jul 16;126(3):311-318.
144. Marr KA, Carter R, Boeckh M, et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood.* 2002;100:4358-4366.
145. Marr KA. Delayed opportunistic infections in hematopoietic stem cell transplantation patients: a surmountable challenge. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012;2012:265-2670.
146. Martin PJ, Schoch G, Fisher L, et al. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood* 1990;76:1464–1472.
147. Martin P, Bleyzac N, Souillet G et al. Relationship between CsA trough blood concentration and severity of acute graft versus- host disease after paediatric stem cell transplantation from matched-sibling or unrelated donors. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32:777-784.
148. Martin PJ, Storer BE, Rowley SD, et al. Evaluation of mycophenolate mofetil for initial treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2009;113:5074-5082.
149. Martin P, Rizzo JD, Wingard JR, et al. First and second-line systemic treatment of acute graft versus host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18:1150-1163.
150. Martin PJ, Inamoto Y, Flowers ME, et al. Secondary treatment of acute graft-versus-host disease: a critical review. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18:982-988.
151. Martinez C, Solano C, Ferrá C, et al. Alemtuzumab as treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease: results of a phase II study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15:639-642.
152. Martino R, Caballero MD, Canals C et al. Reduced-intensity conditioning reduces the risk of severe infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant,* 2001. 28: 341-347.

153. Martino R and Subirà M. "Invasive fungal infections in hematology: new trends," *Ann Hematol.* 2002;81:233-243.
154. Martino R, Caballero MD, Pérez-Simón 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.* 2002;100:2243-2245.
155. 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.
156. Matsumura-Kimoto Y, Inamoto Y, Tajima K et al. Association of Cumulative Steroid Dose with Risk of Infection after Treatment for Severe Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016; 22, 1102-1107.
157. McCreddie KB, Hersh EM, Freireich EJ. Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science* 1971; 171: 293-294.
158. McDonald GB, Bouvier M, Hockenbery DM, et al. Oral beclomethasone dipropionate for treatment of intestinal graft-versus-host disease: a randomized, controlled trial. *Gastroenterology.* 1998;115:28–35.
159. McDonald GB, Cruickshank S, Rodell TC, Hockenberry DM. Oral beclomethasone dipropionate (BDP) for gastrointestinal GVHD: a corticosteroid-sparing treatment with improved survival at day +200. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12:1.
160. McMillan ML, Couriel D, Weidsford DJ et al. A phase 2/3 multicenter randomized clinical trial of ABX-CBL versus ATG as secondary therapy for steroid resistant acute graft versus host disease. *Blood.* 2007; 109: 2657-2662.
161. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru J 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.
162. Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J Infect Dis.* 1986;153:478–488.
163. Mielcarek M, Storer BE, Boeckh M, et al. Initial therapy of acute graft-versus-host disease with low-dose prednisone does not compromise patient outcomes. *Blood.* 2009; 113:2888–2894.
164. Mikulska M, Viscoli C, Orasch C, et al. Aetiology and resistance in bacteraemias among adult and paediatric haematology and cancer patients. *J Infect.* 2014;68:321-331.

165. Mollee P, Morton AJ, Irving I, et al. Combination therapy with tacrolimus and anti-thymocyte globulin for the treatment of steroid-resistant acute graft-versus-host disease developing during cyclosporine prophylaxis. *Br J Haematol* 2001;113:217-223.
166. Mooney BR., Reeves SA, Larson E. Infection control and bone marrow transplantation. *Am J Infec Control*, 1993. 21: 131-138.
167. Moran E, Carbone F, Augusti V et al. Proteasome inhibitors as immunosuppressants: biological rationale and clinical experience. *Semin Hematol*. 2012;49:270-276.
168. Mori T, Kato J, Shimizu T et al. Effect of early posttransplantation tacrolimus concentration on the development of acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18:229-234.
169. Morrison M, Samwick AA. Intramedullary (sternal) transfusion of human bone marrow. *JAMA* 1940; 115: 1708-1711.
170. Mrsić M, Labar B, Bogdanić V et al. Combination of cyclosporine and methotrexate for prophylaxis of acute graft versus host disease after allogeneic bone marrow transplantation for leukaemias. *Bone Marrow Transplant*. 1989;4:95-96.
171. Murry DJ, Crom WR, Reddick WE et al. Liver volume as a determinant of drug clearance in children and adolescents. *Drug Metab Dispos* 1995; 23: 1110–1116.
172. Nakamura Y, Takeuchi H, Okuyama K, et al. Evaluation of appropriate blood level in continuous intravenous infusion from trough concentrations after oral administration based on area under trough level in tacrolimus and cyclosporine therapy. *Transplant Proc* 2005;37:1725–1727.
173. Nash RA, Antin JH, Karanes C et al. Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood* 2000; 96: 2062–2068.
174. Nestel FP, Price KS, Seemayer TA, Lapp WS. Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease. *J Exp Med*. 1992; 175: 405-413.
175. Nichols WG, Corey L, Gooley T, et al. High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J Infect Dis*. 2002;185:273–282.
176. Ninin E, Milpied N, Moreau P, et al. Longitudinal study of bacterial, viral and fungal infections in adult recipients of bone marrow transplants. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 41-47.

177. Olson, J. A. et al. NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood*. 2010;115:4293-301.
178. Ogawa N, Kanda Y, Matsubara MS et al. Increased incidence of acute graft-versus-host disease with the continuous infusion of cyclosporine A compared to twice-daily infusion. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 549–552.
179. Oshima K, Kanda Y, Nakasone H et al. Decreased incidence of acute graft-versus-host disease by continuous infusion of cyclosporine with a higher target blood level. *Am. J. Hematol.* 2008; 83:226–232.
180. Parikh C, Sandmaier B, Storb R et al. Acute renal failure after nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology*.2004;15:1868-1876.
181. Park JH, Lee HJ, Kim SR, et al. Etanercept for steroid-refractory acute graft versus host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Korean J Intern Med.* 2014 ;29:630-636.
182. Parody R, Martino R, de la Cámara R, et al. Fungal and viral infections after allogeneic hematopoietic transplantation from unrelated donors in adults: improving outcomes over time. *Bone Marrow Transplantation*.2015; 50, 274-281.
183. Passweg JR, Baldomero H, Bader P et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51:786-792.
184. Peccatori J, Forcina A, Clerici D et al. Sirolimus-based graft-versus-host disease prophylaxis promotes the in vivo expansion of regulatory T cells and permits peripheral blood stem cell transplantation from haploidentical donors. *Leukemia.* 2015;29:396-405.
185. Peled JU, Hanash AM, Jenq RR, et al. Role of the intestinal mucosa in acute gastrointestinal GVHD. *Blood.* 2016;128:2395-2402.
186. Perfetti P, Carlier P, Strada P, et al. Extracorporeal photopheresis for the treatment of steroid refractory acute GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2008;42:609-617.
187. Perez-Simon JA, Garcia-Escobar I, Martinez J, et al. Antibiotic prophylaxis with meropenem after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*2004; 33:183–187.
188. Perez-Simón JA, Martino R, Parody R et al. The combination of sirolimus plus tacrolimus improves outcome after reduced-intensity conditioning, unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation compared with cyclosporine plus mycophenolate. *Haematologica.* 2013 ;98:526-532.

189. Perreault C, BClanger R, Gyger M, et al. The mechanism of graft-host-tolerance in murine radiation chimeras transplanted across minor histocompatibility barriers. *Bone Marrow Transplant* 1989; 4: 83-87.
190. Peters C, Minkov M, Gadner H et al. Statement of current majority practices in graft-versus-host disease prophylaxis and treatment in children. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 405–411.
191. Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, et al. The significance of HLA-DRB1 matching on clinical outcome after HLA-A, B, DR identical unrelated donor marrow transplantation. *Blood*;1995;86:1606–1613.
192. Pidala J, Kim J, Field T, et al. Infliximab for managing steroidrefractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15:1116-1121.
193. Pidala J, Anasetti C. Glucocorticoid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*; 2010; 16: 1504-1518.
194. Piñana JL, Valcárcel D, Martino R, et al. Encouraging results with inolimomab (anti-IL-2 receptor) as treatment for refractory acute graftversus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12:1135-1141.
195. Piñana JL, Martino R, Valcárcel D, et al. Study of Kidney Function Impairment after Reduced-Intensity Conditioning Allogeneic Hematopoietic StemCell Transplantation. A Single-Center Experience. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009; 15: 21-29.
196. Piñana JL, Martino R, Barba P et al. Cytomegalovirus infection and disease after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation: single-centre experience. *Bone Marrow Transplantation*. 2010;45:534-542.
197. Piñana JL, Valcárcel D, Fernández-Avilés F et al. MTX or mycophenolate mofetil with CsA as GVHD prophylaxis after reduced-intensity conditioning PBSCT from HLA-identical siblings. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45:1449-456.
198. Piñana JL, Martino R, Gayoso J, et al. Reduced intensity conditioning HLA identical sibling donor allogeneic stem cell transplantation for patients with follicular lymphoma: long-term follow-up from two prospective multicenter trials. *Haematologica*. 2010;95:1176-1182.
199. Polchert, D. et al. IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol*. 2008;38:1745-1755.
200. Poutsiaka D, Munson D, Price L, et al. Blood stream infection (BSI) and acute GVHD after hematopoietic SCT (HSCT) are associated. *Bone Marrow Transplant*.2011;46:300-307.
201. Punnett A, Sung L, Price V et al. Achievement of target cyclosporine concentrations as a predictor of severe acute graft versus host disease in children

- undergoing hematopoietic stem cell transplantation and receiving cyclosporine and methotrexate prophylaxis. *Ther Drug Monit* 2007; 29: 750–757.
202. Quellmann S, Schwarzer G, Hübel K, Corticosteroids for preventing graft-versus-host disease after allogeneic myeloablative stem cell transplantation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;CD004885.
 203. Ram R, Gafter-Gvili A, Yeshurun M et al. Prophylaxis regimens for GVHD: systematic review and meta-analysis. *Bone Marrow Transplant* 2009; 43: 643–653.
 204. Ram R, Ben-Bassat I, Shpilberg O, Polliack A, Raanani P. The late adverse events of rituximab therapy-rare but there! *Leuk Lymphoma*. 2009; 50:1083-1095.
 205. Rao K, Rao A, Karlsson H, et al. Improved survival and preserved antiviral responses after combination therapy with daclizumab and infliximab in steroid-refractory graft-versus-host disease. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2009; 31:456–461.
 206. Rashidi A, DiPersio JF, Sandmaier BM, et al. Steroids Versus Steroids Plus Additional Agent in Frontline Treatment of Acute Graft-versus-Host Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22:1133-1137.
 207. Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorka D, et al. Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 1998;92:2303–2314.
 208. Remberger M, Aschan J, Barkholt L, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with antithymocyte globulin. *Clin Transplant*. 2001;15:147-153.
 209. Remberger M, Persson M, Mattsson J et al. Effects of different serum-levels of ATG after unrelated donor umbilical cord blood transplantation. *Transpl Immunol*. 2012;27:59-62.
 210. Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M et al. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood*. 2006;108:1291-1297.
 211. Riches ML, Trifilio S, Chen M, Ahn KW, Langston A, Lazarus HM et al. Risk factors and impact of non-Aspergillus mold infections following allogeneic HCT: a CIBMTR infection and immune reconstitution analysis. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51:322.
 212. Ringden O, Labopin M, Gluckman E et al. Graft-versus leukemia effect in allogeneic marrow transplant recipients with acute leukemia is maintained using cyclosporin A combined with methotrexate as prophylaxis. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18: 921–929.

213. Roca I, Akova M, Baquero F, et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect.* 2015; 6: 22-29.
214. Roddy JV, Haverkos BM, McBride A, et al. Tocilizumab for steroid refractory acute graft-versus-host disease. *Leuk Lymphoma.* 2016;57:81-85.
215. Rotta M, Storer BE, Storb R et al. Impact of recipient statin treatment on graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010 ;16:1463-1466.
216. Rowlings PA, Przepiorka D, Klein JP et al. IBMTR severity index for grading acute graft versus host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. *Br J Haematol,* 1997; 97: 855-864.
217. Saavedra S, Sanz G, Jarque I et al. Early infections in adult patients undergoing unrelated donor cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002; 30: 937-943.
218. Sale GE, Alavaikko M, Schaeffers KM, et al. Abnormal CD4:CD8 ratios and delayed germinal center reconstitution in lymph nodes of human graft recipients with graft-versus-host disease (GVHD): an immunohistological study. *Exp Hematol.* 1992;20:1017-1021.
219. Saliba RM, Couriel DR, Giralt S, et al. Prognostic value of response after upfront therapy for acute GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2012;47:125-131.
220. Satlin MJ, Soave R, Racanelli AC et al. The emergence of vancomycin-resistant enterococcal bacteremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Leuk Lymphoma.* 2014 ;55:2858-2865.
221. Sato M, Nakasone H, Oshima K , et al. Prediction of transplant-related complications by C-reactive protein levels before hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2013 ;48:698-702.
222. Satwani P, Harrison L, .Morris E et al. Reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation in adults and children with malignant and nonmalignant diseases: end of the beginning and future challenges. *Biol Blood Marrow Transplant.*2005;1:403-422.
223. Sava A, Roger T. Targeting toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases. 2013. *Front Immunol;* 4:387.
224. Sayer HG, Longton G, Bowden R, et al. Increased risk of infection in marrow transplant patients receiving methylprednisolone for graft versus-host disease prevention. *Blood.* 1994;84:1328-1332.
225. Shapira MY, Resnick IB, Dray L, et al. A new induction protocol for the control of steroid refractory/dependent acute graft versus host disease with alefacept and tacrolimus. *Cytotherapy.* 2009;11:61-67.

226. Schneidawind D, Pierini A, Negrin RS. Regulatory T cells and natural killer T cells for modulation of GVHD following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2013 31;122:3116-3121.
227. Schots R, Kaufman L, Van Riet I, et al. Monitoring of C-reactive protein after allogeneic bone marrow transplantation identifies patients at risk of severe transplant-related complications and mortality. *Bone Marrow Transplant*. 1998;22:79-85.
228. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, et al. . Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*. 1999;285:412-415.
229. Slavin S, Gurevitch O, Zhu J, et al. Deletion of donor-reactive cells followed by stem cell transplantation in recipients treated with total lymphoid-irradiation as a means for induction of transplantation tolerance to organ allografts and xenografts. *Transplant Proc*. 1998 ;30:4021-4022.
230. Song M, Chung J, Seol Y et al. Influence of lactate dehydrogenase and cyclosporine a level on the incidence of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation, *J Korean Med Sci*. 2009;24:555-560.
231. Srinivasan R, Chakrabarti S, Walsh T, et al. Improved survival in steroid-refractory acute graft versus host disease after non-myeloablative allogeneic transplantation using a daclizumab-based strategy with comprehensive infection prophylaxis. *Br J Haematol*. 2004;124:777-786.
232. Storb R, Epstein RB, Graham TC et al. Methotrexate regimens for control of graft-versus-host disease in dogs with allogeneic marrow grafts. *Transplantation*. 1970;9:240-246.
233. Storb R, Deeg HJ, Thomas ED et al. Marrow transplantation for chronic myelocytic leukemia: a controlled trial of cyclosporine versus methotrexate for prophylaxis of graft-versus-host disease. *Blood*. 1985;66:698-702.
234. Storb R, Thomas ED: Graft-versus-host disease in dog and man: The Seattle experience. *Immunol Rev* 1985; 88: 215.
235. Sudres M, Norol F, Trenado A, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol*. 2006 ;176:7761-7767.
236. Sugita J, Matsushita T, Kashiwazaki H et al. Efficacy of folinic acid in preventing oral mucositis in allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients receiving MTX as prophylaxis for GVHD. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47:258-264.
237. Sun K, Li M, Konopleva M, et al. The synthetic triterpenoid, CDDO, suppresses alloreactive T cell responses and reduces murine early acute graft-versus-host disease mortality. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13:521-529.

238. Yamane T, Yamamura R, Aoyama Y, et al. Infliximab for the treatment of severe steroid refractory acute graft-versus-host disease in three patients after allogeneic hematopoietic transplantation. *Leuk Lymphoma*. 2003;44:2095-2097.
239. Yaping Sun, Isao Tawara, Tomomi Toubai et al. Pathophysiology of Acute Graft-vs-Host Disease: Recent Advances. *Transl Res*. 2007 ; 150: 197–214.
240. Theurich S, Fischmann H, Shimabukuro-Vornhagen A et al. Polyclonal anti-thymocyte globulins for the prophylaxis of graft-versus-host disease after allogeneic stem cell or bone marrow transplantation in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;9:CD009159.
241. Thomas ED, Lochte HL, Cannon JH, et al. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest* 1959; 38: 1709-1716.
242. Tsuboi A, Oka Y, Kyo T. Long term WT-1 peptide vaccination for patients with acute myeloid leukemia with minimal residual disease. *Leukemia*. 2012; 26: 1410-1413.
243. Ullmann AJ, Schmidt-Hieber M, Bertz H, et al. Infectious diseases in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: prevention and prophylaxis strategy guidelines 2016. *Ann Hematol*. 2016;95:1435-1455.
244. Urbano-Ispizua A, Rozman C, Martínez C et al. Rapid engraftment without significant graft-versus-host disease after allogeneic transplantation of CD34+ selected cells from peripheral blood. *Blood* 1997; 89: 3967-3973.
245. Valcárcel 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*. 2005;74:144-151.
246. van Groningen LF, Liefferink AM, de Haan AF. Combination Therapy with Inolimomab and Etanercept for Severe Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22:179-182.
247. Van der Velden WJ, Netea MG, deHaan AF, et al. Role of the mycobiome in human acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* .2013.;19:329–332.
248. Van Hoef ME. Towards a rational graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis: rituximab should not be forgotten. *Haematologica*. 2013;98:40-41.
249. van Lint MT, Uderzo C, Locasciulli A, et al. Early treatment of acute graft-versus-host disease with high- or low-dose 6-methylprednisolone: a multicenter randomized trial from the Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Blood*. 1998; 92:2288–2293.
250. van Lint MT, Milone G, Leotta S, et al. Treatment of acute graft-versus-host disease with prednisolone: significant survival advantage for day +5 responders and no

- advantage for nonresponders receiving anti-thymocyte globulin. *Blood*. 2006;107:4177–4181.
251. Vo PT, Pantin J, Ramos C et al. Conditioning with rabbit versus horse ATG dramatically alters clinical outcomes in identical twins with severe aplastic anemia transplanted with the same allogeneic donor. *J Hematol Oncol*. 2015 26;8:78.
 252. Vogelsang GB, Hess AD. Graft-versus-host disease: new directions for a persistent problem. *Blood* 1994; 84: 2061-2067.
 253. Vydra J, Shanley RM, George I, Ustun C, Smith AR, Weisdorf DJ et al. Enterococcal bacteremia is associated with increased risk of mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2012;55:764-770.
 254. Wandroo F, Auguston B, Cook M, et al. Successful use of Campath-1H in the treatment of steroid refractory liver GvHD. *Bone Marrow Transplant*. 2004;34: 285-287.
 255. Wang L, Gu Z, Zhai R et al. The efficacy and safety of sirolimus-based graft-versus-host disease prophylaxis in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Transfusion*. 2015;55: 2134-2141.
 256. Wang W. Gut microbiota and allogeneic transplantation. *J Transl Med*. 2015; 13: 275.
 257. Weber D, Oefner PJ, Dettmer K. Rifaximin preserves intestinal microbiota balance in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2016 ;51:1087-1092.
 258. Weisdorf D, Haake R, Blazar R, et al. Treatment of moderate/severe acute graft versus host disease after allogeneic bone marrow transplantation: an analysis of clinical risk features and outcome. *Blood*. 1990; 76: 1464-1472.
 259. Willemze AJ, Cremers SC, Schoemaker RC et al. Cyclosporin kinetics in children after stem cell transplantation. *Br J Clin Pharmacol* 2008; 66: 539–545.
 260. Willenbacher W, Basara N, Blau IW, Fauser AA, Kiehl MG. Treatment of steroid refractory acute and chronic graft-versus-host disease with daclizumab. *Br J Haematol*. 2001;112:820-823.
 261. Williamson EC, Millar MR, Steward CG et al. Infections in adults undergoing unrelated donor bone marrow transplantation. *Br J Haematol*, 1999. 104: 560-568.
 262. Wingard JR, Nash RA, Przepiora D, et al. Relationship of tacrolimus (FK506) whole blood concentrations and efficacy and safety after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1998;4:157-163.

263. Wolf D, Roessler V, Steiner B, et al. Treatment of steroid-resistant acute graft-versus-host disease with daclizumab and etanercept. *Bone Marrow Transplant* 2005;35:1003-1010.
264. Wolf D, Schleuning M, von Harsdorf S et al. Consensus Conference on Clinical Practice in Chronic GVHD: Second-Line Treatment of Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17:1-17.
265. Wolff D, von Lilienfeld-Toal M, Wolf AM, et al. Novel treatment concepts for graft-versus-host disease. *Blood*. 2012; 119:16-25.
266. Wysocki CA, Panoskaltis-Mortari A, Blazar BR et al. Leukocyte migration and graft-versus-host-disease. *Blood*. 2005;105:4191-4199.
267. Yahav D, Gafter-Gvili A, Muchtar E, et al. Antiviral prophylaxis in haematological patients: systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2009;45:3131-3148.
268. Yamane T, Yamamura R, Aoyama Y, et al. Infliximab for the treatment of severe steroid refractory acute graft-versus-host disease in three patients after allogeneic hematopoietic transplantation. *Leuk Lymphoma*. 2003;44:2095-2097.
269. Yáñez L, Bermúdez A, Insunza A, et al. Unexpected outbreak of Epstein-Barr virus post-transplantation lymphoproliferative disorder after hematopoietic stem cell transplantation conditioning with thymoglobulin. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20:1457-1458.
270. Yee GC, Self SG, McGuire TR, Carlin J, Sanders JE, Deeg HJ. Serum cyclosporine concentration and risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1988;319:65-70.
271. Young JA, Logan BR, Wu J, Wingard JR, Weisdorf DJ, Mudrick C et al. Infections after Transplantation of Bone Marrow or Peripheral Blood Stem Cells from Unrelated Donors. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22:359-370.
272. Zeighami S, Hadjibabaie M, Ashouri A, et al. Assessment of cyclosporine serum concentrations on the incidence of acute graft versus host disease post hematopoietic stem cell transplantation. *Iran J Pharm Res*. 2014 Winter;13:305-312.
273. Zeiser R, Marks R, Bertz H et al. Immunopathogenesis of acute graft-versus-host disease: implications for novel preventive and therapeutic strategies. *Ann Hematol*. 2004;83:551-65.
274. Zeiser R, Burchert A, Lengerke C, et al. Ruxolitinib in corticosteroid-refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: a multicenter survey. *Leukemia*. 2015 ;29:2062-2068.

