

Movilización a sangre periférica, recolección por aféresis y criopreservación de precursores hematopoyéticos (CPSP), cromosoma Filadelfia (Phi) y/o BCR/ABL negativos post-quimioterapia con distintos regímenes en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC)

C. Dengra, N. Kotliar, G. Lucero, M. Ardaiz, A. Sánchez Luceros, F. Garnier, M. Alcón Alvarez, R. Campestri, G. Garay, V. Birman, I. Larripa, A. Migliorini, R. Bayo, B. Koziner

Unidad de Trasplante de Médula Ósea de Clínica Independencia y Unidad de Investigaciones Oncohematológicas, Bs. As.



ARTICULO ORIGINAL

HEMATOLOGIA, Vol. 1 N° 1: 17-21
Enero - Abril, 1996

INTRODUCCION

La LMC es una enfermedad mieloproliferativa clonal de las células hematopoyéticas germinales. Compromete las líneas de diferenciación mieloide, eritroide, megacariocítica y linfoide, pero no los fibroblastos medulares. Se caracteriza por una heterogénea evolución entre pacientes, un curso bi o trifásico (fase crónica-fase acelerada-crisis blástica), y por un marcador cromosómico presente en las células leucémicas, el cromosoma Filadelfia que resulta de la translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 lo que da origen a un gen quimérico bcr/abl, cuya acción se traduce en un aumento de la actividad de tirosin quinasa.¹

Hasta ahora los tratamientos utilizados, a excepción del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (de médula ósea y/o sangre periférica) no han sido demasiado exitosos. Así, los tratamientos con quimioterapia (busulfán, hidroxiurea, etc), no han logrado la curación de la enfermedad y en general no muestran demasiada diferencia entre ellos cuando se evalúa la sobrevida, total³. Con Interferón alfa (IFN) se logra remisión citogenética completa en 5 a 26% de los pacientes y podría obtenerse una prolongación en la sobrevida pero es dudoso su potencial curativo. Por último, el trasplante alogénico ha demostrado que puede lograr la curación o sobrevida a largo plazo pero presenta como limitaciones que sólo accede a él una minoría de pacientes (edad menor de 50 años, posibilidad de contar con un donante de progenitores hematopoyéticos parcial o totalmente histocompatible relacionado o no familiarmente), los que a su vez soportan una morbimortalidad que llega al 50% según los reportes.

Estos pobres o limitados resultados justifican el intento de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que puedan extender la duración de la fase crónica y prolongar la sobrevida. El autotrasplante puede ser una opción alternativa, sobre todo para aquellos que por cualquier motivo no pueden acceder a un trasplante alogénico y/o no responden al tratamiento con Interferon alfa.

La LMC no es una indicación frecuente de trasplante autólogo debido a la dificultad en erradicar las células Phi (+) de la médula ósea. Sin embargo, actualmente hay evidencias de que células progenitoras hematopoyéticas no-leucémicas se pueden obtener post-quimioterapia intensiva y tendrían una ventaja proliferativa sobre el clon Phi (+) que habitualmente suprime la proliferación de las células Phi (-). Este procedimiento (quimioterapia intensiva -> recolección de células hematopoyéticas Phi (-) -> autotrasplante) se puede aplicar tanto en pacientes en crisis blástica como en fase crónica.²

Tomando en cuenta los antecedentes referidos, nuestro grupo se fijó los siguientes objetivos.

1. Reclutar células progenitoras Phi negativas y/o bcr/abl negativas en pacientes con leucemia mieloide crónica Phi positivo y/o bcr/abl positivo.
2. Recolectar los progenitores Phi negativos y/o bcr/abl negativos en cantidad suficiente para asegurar una recuperación hematológica adecuada luego de un régimen ablativo de quimioterapia en altas dosis.
3. Determinar cuales de los regímenes utilizados para reclutar progenitores Phi negativos y/o bcr/abl negativos son los más eficientes y menos tóxicos.

MATERIAL Y METODOS

Entre noviembre de 1994 y enero de 1997 diecisiete pacientes con LMC (15 con diagnóstico de LMC Phi+ y 2 con diagnóstico de LMC Phi(-) bcr/abl(+)) sin un dador familiar histoiéntico y/o resistentes a IFN, ingresaron a nuestro protocolo.

Once pacientes fueron movilizados en 1era fase crónica (FC), 3 pacientes en 2ª FC luego de crisis blástica y 3 pacientes en fase acelerada (FA).

El tiempo medio desde el diagnóstico hasta su inclusión en este estudio fue de 25 meses (3-84 meses). Se incluyeron 14 hombres y 3 mujeres, con un rango de edades de 21 a 56 años (mediana: 34 años). El régimen consistió en: idarubicina 8 mg/m²/día, días 1 a 5; Ara-C 800 mg/m²/día, días 1 a 5 y etoposide 150 mg/m²/día, días 1 a 3 (protocolo ICE: 6 pacientes); mini ICE: 1 paciente (consiste en las mismas drogas pero durante 3 días) o protocolo IdAc¹⁹ (10 pacientes): idarubicina: 10 mg/m²/día, días 1 y 2 y Ara-C: 600 mg/m²/día, días 1 a 5. En los tres casos se administró a continuación G-CSF: 5-10 µg/kg/día vía subcutánea hasta que se completaron las recolecciones.

Las leucaféresis se realizaron con un separador celular COBE SPECTRA a partir de un recuento leucocitario mayor a 800/µl y se continuaron hasta que el recuento de glóbulos blancos fue mayor a 3.000/µl o cuando el total de células mononucleares fue superior a 12 x 10⁹/Kg de peso o el número de células CD34+ recolectadas fue superior a 2 x 10⁶/Kg de peso.

Las células recolectadas fueron evaluadas con estudio citogenético y molecular (BCR/ABL en ARMm por blotting o PCR).

Cuando los pacientes requirieron transfusiones de eritrocitos y/o concentrados plaquetarios, éstos fueron irradiados con 2.500 cGy.

RESULTADOS

Los 17 pacientes (ver tabla 1) completaron el protocolo de movilización. Todos presentaron neutropenia febril y mucositis. Tres de 17 pacientes tuvieron episodios hemorrágicos leves (urogenital). No se produjo ninguna muerte. Las recolecciones se iniciaron entre 13 a 34 días (mediana 24) del comienzo de la quimioterapia. Se recolectaron CPSP a partir de un recuento leucocitario medio de 1,2 x 10⁹ (0,9-9,3).

Se realizaron un total de 2 a 8 leucaféresis (mediana 4) por paciente.

El análisis citogenético de las células recolectadas mostró ausencia de metafases Phi positivas en 7 de 15 (46,6%) pacientes con LMC Phi(+). En los 2 pacientes Phi(-), BCR/ABL (+) se obtuvo respuesta molecular. Las respuestas en relación al esquema utilizado

TABLA 1
CARACTERISTICAS Y RESULTADOS OBTENIDOS EN 17 PACIENTES

Caso	Edad Años	Fase	Phi BCR/ABL Pre	Diag-Movil Intervalo en meses	Día 1 Rec	Cant. Rec	Leu. Inic. X 10(9)/L	Cel. Tot. Criop. X 10(8)/Kg	Phi BCR/ABL Post
1	43	1a. FC	+ NR	31 ICE	25	4	1,1	9,36	- +
2	44	2a. FC	+ NR	24 ICE	26	6	1,0	3,58	- +
3	34	FA	+ NR	84 ICE	25	4	1,3	14,83	+ +
4	34	2a. FC	- +	3 ICE	20	4	1,2	7,07	- -
5	21	1a. FC	- +	77 ICE	34	4	1,2	7,47	- -
6	33	1a. FC	+ NR	25 IdAc	29	3	1,5	10,20	- +
7	47	1a. FC	+ +	50 IdAc	24	4	0,9	14,70	+ +
8	46	1a. FC	+ +	24 IdAc	23	5	1,2	6,40	+ NR
9	22	1a. FC	+ +	4 IdAc	25	6	1,0	10,80	+ +
10	37	1a. FC	+ +	7 IdAc	27	6	0,9	13,26	- -
11	31	2a. FC	+ +	7 IdAc	13	2	9,3	24,00	- +
12	27	1a. FC	+ +	41 IdAc	24	8	0,9	14,00	+ +
13	35	1a. FC	+ +	64 IdAc	26	4	1,2	17,70	- +
14	32	FA	+ +	46 ICE	22	4	2,4	12,00	+ +
15	56	FA	+ +	10 m ICE	18	2	6,1	17,00	+ +
16	49	1a. FC	+ NR	65 IdAc	20	3	1,7	18,70	+ +
17	22	1a. FC	+ +	5 IdAc	17	4	0,9	14,60	- -

Phi BCR/AbL Pre: Citogenético y molecular previos al tratamiento

Diag-Movil: Tiempo entre el diagnóstico y el inicio del protocolo

Día 1 Rec: Primer día de recolección luego de quimioterapia

Cant. Rec.: Número de recolecciones realizadas

Leu. Inic.: Cantidad de leucocitos en sangre a la primera recolección

Phi BCR/ABL Post.: Citogenético y molecular del producto obtenido por aféresis

NR: No realizado

Cel. Tot. Criop.: Celularidad total criopreservada

fueron: ICE - mICE: 57% (4/7) respuestas citogenéticas y/o moleculares y con IdAc 50% (5/10), encontrándose 2/10 respuestas citogenéticas y moleculares. La mediana de células recolectadas y criopreservadas fue de $13,26 \times 10^8$ /Kg de peso, con un rango entre 3,58 y $24,0 \text{ cel} \times 10^8$ /Kg de peso (Tabla 1)

DISCUSION

Inicialmente el autotrasplante se aplicó en crisis blástica con el objetivo de volver a la fase crónica. En cambio cuando se realiza en fase crónica el objetivo es lograr un período de hematopoyesis normal lo que podría prolongar la duración de la fase crónica y de la sobrevivida.

Distintos grupos continúan realizando autotrasplantes de médula ósea y/o de CPSP recolectados en pacientes en fase crónica (autotrasplantes «directos» sin purga)^{4,5}. Recientemente en Viena, Reiffers reportó la experiencia del EBMT Group en 170 pacientes con LMC sometidos a autotrasplante en fase crónica, con resultados alentadores¹³.

Pero actualmente la tendencia es obtener una población purificada de células Phi-negativas, ya sea con técnicas in vitro o in vivo.

In vitro, el grupo de Vancouver⁶ realiza cultivos de 10 días de médula ósea tipo Dexter. En este procedimiento se observa una ventaja proliferativa de las células normales sobre las células Phi(+) y ellos han desarrollado un programa clínico de autotrasplante. Otros desarrollos promisorios se basan en métodos de purga con drogas citostáticas, por ejemplo mafosfamid⁷, o con anticuerpos dirigidos contra péptidos de fusión BCR/ABL, etc.¹¹.

In vivo se utiliza quimioterapia para movilizar células progenitoras Phi(-). Se sabe que las células progenitoras mieloides entran a la circulación en gran cantidad entre 1 a 3 semanas luego de un curso de drogas citostáticas, que existe un número alto de unidades formadoras de colonias (CFUs) en la sangre de pacientes con LMC no tratada; que son detectables células Phi(-) en pacientes recién diagnosticados en los que se encuentran en alta concentración células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC). Basados en esto Carella y colaboradores⁹ en pacientes con LMC tanto en fase blástica como crónica, usaron un tratamiento de quimioterapia intensiva y posteriormente recolectaron células mononucleares de sangre periférica por leucaféresis. Ellos observaron que las recolecciones Phi(-) eran más frecuentemente obtenidas en pacientes en fase crónica y dentro de los 2 años del diagnóstico^{14,18}. Esta experiencia se resume en la Tabla 2. Ellos trataron 136 pacientes con LMC Phi(+) en diferentes fases de la enfermedad con esquemas ICE o mini ICE (m ICE). Treinta y ocho pacientes fueron movilizados durante la fase blástica (FB), 28 pacientes durante la fase acelerada (FA) y 70 pacientes en fase crónica (FC). Veintidos pacientes en FC estaban en el primer año del diagnóstico y no habían sido tratados con IFN (Grupo A), los 48 pacientes restantes habían recibido tratamiento previo con IFN: 22 pacientes por más de 12 meses (Grupo B) y 26 pacientes por menos de 12 meses (Grupo C).

Las recolecciones post-régimen de movilización fueron Phi(-) en el Grupo A: 82%, Grupo B: 50% y en el Grupo C: 65% (entre respuestas citogenéticas completas y mayores). FB: 28% y FA: 28%.

TABLA 2
RESULTADOS CITOGENETICOS CON PROTOCOLO ICE O m ICE DE ACUERDO A LA FASE DE LA ENFERMEDAD.
EXPERIENCIA DE GENOVA (1989-1996)

	Fase Blástica	Fase Acelerada	Al Diagnóstico		Fase Crónica	
			< 1 año	> 1 año		
Pacientes	(38)	(28)		(22)	(26)	(22)
Trat. de movilización	ICE	ICE	ICE	17	21	18
CPSP Phi(-)	8(21%)	5(17%)	m ICE	5	5	4
			ICE	11(64%)	9(43%)	4(22%)
Respuesta Citogenética Mayor (RCM)	3	3		3(60%)	2(40%)	0(0%)
			ICE	3(17%)	3(14%)	5(27%)
			m ICE	1(20%)	3(60%)	2(50%)
Total Phi(-)+RC M	11(28%)	8(28%)	ICE	14(82%)	12(57%)	9(50%)
			m ICE	4(80%)	5(100%)	2(50%)

ICE: idarrubicina 8 mg/m²/día-días 1-5; Ara-C 800 mg/m²/día-días 1-5 y etoposide 150 mg/m²/día-días 1-3.
Mini-ICE: las mismas drogas durante 3 días.

Se trasplantaron 33 pacientes (Grupo A: 12 pacientes; Grupo B y C: 21 pacientes). En el Grupo A todos los pacientes están vivos y en remisión hematológica y 6 de ellos tienen remisión citogenética en la médula ósea 9-20 meses post-autotrasplante. Esta remisión es mantenida con IFN e interleukina-2. En los Grupos B y C 15 pacientes están vivos y 2 de ellos son Phi(-) después de 5-55 meses. Las causas de muerte post-autotrasplante fueron: infecciones debidas a aplasia prolongada (2 pacientes) y evolución blástica (4 pacientes).

Otros grupos están intentando actualmente movilizar stem cells con diferentes regímenes quimioterápicos.^{8, 10, 19}

Recientemente se han comunicado otras modalidades para movilizar células progenitoras Phi(-).

- En pacientes con buena respuesta a IFN, se demostró que se pueden recolectar suficientes progenitores de sangre periférica Phi(-) después de la administración de G-CSF. Veintitrés pacientes de 22 a 62 años, tiempo medio de diagnóstico: 38 meses (8-80) recibieron G-CSF 150 µg/m²/día durante 6-12 días, doce pacientes continuaron recibiendo IFN mientras que once pacientes lo suspendieron el día previo a comenzar con G-CSF. Se lograron recolecciones adecuadas en ambos grupos, con una tendencia a mejor respuesta citogenética en el grupo que continuó IFN. Concluyen que la administración de G-CSF a pacientes con LMC en tratamiento con IFN es seguro, no produce progresión de enfermedad y puede resultar en recolecciones satisfactorias sin suspender el IFN.^{15, 16}

- Altas dosis de hidroxurea y G-CSF: en pacientes mayores de 55 años y con complicaciones clínicas se realizaron movilizaciones con hidroxurea 3,5 g/m² /día por 7 días y G-CSF¹⁷.

Nuestro estudio demuestra que en LMC es factible la recolección de CPSP Phi (-) y/o BCR/ABL (-) en la fase temprana de recuperación post-quimioterapia mieloablativa (9 de 17 respuestas citogenéticas y/o moleculares).

Nuestra experiencia previa¹² y los resultados que acá se reportan también confirman la presencia de progenitores hematopoyéticos normales en LMC y su persistencia aún en pacientes previamente tratados con IFN y que no lograron una remisión citogenética.

La cantidad de células que hemos recolectado en cada caso se supone suficiente para restaurar la hematopoyesis cuando se reinfunden después de quimioterapia de condicionamiento pretrasplante. Esto es avalado por los resultados de distintos grupos y por nuestra experiencia (8/8 pacientes trasplantados con sus recolecciones Phi(-) y/o BCR/ABL(-) tuvieron recuperación hematológica) datos no presentados en este trabajo.

Desde el punto de vista de la respuesta y toxicidad en relación a los regímenes empleados, no cabe ninguna conclusión, ya que los números son pequeños y no se observa una marcada diferencia entre las combinaciones utilizadas.

Los resultados obtenidos indican que esta modalidad terapéutica debe ser tenida en cuenta como una opción de gran validez para los pacientes recientemente diagnosticados que carezcan de donantes para un trasplante alogénico o no respondan al uso de IFN.

Agradecimientos: Agradecemos a la Srta. Virginia Bartolomé por la transcripción del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kantarjian HM et al: Chronic myelogenous leukemia: a concise update. *Blood*, vol 82 N 3: 691-703, 1993.
2. O'Brien SG, Goldman JM. Autografting in Chronic Myeloid Leukemia. *Blood Reviews* 8: 63-69, 1994.
3. Hehlmann R. et al: Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. *Blood*, Vol 82. N° 2, 396-407, 1993.
4. Kantarjian HM et al: High doses of cyclophosphamide, etoposide and total body irradiation followed by autologous stem cell transplantation in the management of patients with chronic myelogenous leukemia, *Bone Marrow Transplantation* 14: 57-61, 1994.
5. Reiffers J, Goldman J, Metoni G, Cahn JY: Autologous stem cell transplantation in chronic myelogenous leukemia a retrospective analysis of the European Group for Bone Marrow Transplantation: *Bone Marrow Transplantation*; 14: 407-410, 1994.
6. Barnett M Y et al: Autografting with cultured marrow in chronic myeloid leukemia results of a pilot study. *Blood* Vol. 84: 724-732, 1994.
7. Carto-Stella C et al: Autologous transplant for chronic myelogenous leukemia using marrow treated ex viva with mafosfamide: *Bone Marrow Transplantation* 14: 425-432, 1994.
8. Bengt Simonsson et al. Intensive treatment in order to minimize the Ph- positive clone in chronic myelogenous leukemia, *Leukemia and Lymphoma* 1992, Vol 7, Supplement: 55-57.
9. Carella AM, et al: Collection of «normal» blood repopulating cells during early hemopoietic recovery after intensive conventional chemotherapy in chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplantation*; 12: 267-271, 1993.
10. Kantarjian HM et al: Collection of peripheral-blood diploid cells from chronic myelogenous leukemia patients early in the recovery phase from myelosuppression induced by intensive-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 13: 553-559, 1995.
11. O'Brien S and Goldman J: Current approaches to hematopoietic stem-cell purging in chronic myeloid leukemia. Editorial *J Clin Oncol* 13: 541-546, 1995.
12. Dengra C, Kotliar N, Lucero G, Ardaiz MC, Sánchez Luceros A, Garnier F, Alcon Alvarez M, Campestrí R, Garay G, Birman V, Migliorini A, Bayo R, Koziner B. Mobilization of Philadelphia negative (Ph-) and/or BCR/ABL (-) blood progenitor cells (BPCs) during early hematopoietic recovery after ICE/IdAc chemotherapy in Chronic Myeloid Leukemia (CML). *Blood* 88 (10) Suppl. 1 Abs. 3517, 1996.
13. Reiffers J, Goldman J, Meloni G, Cahn JY, Apperley J on behalf of the EBMT Working Party for Acute Leukemias. Autologous

- stem cell transplantation (ASCT) for chronic myeloid leukemia (CML) in chronic phase: **A report of the European Blood and Marrow Transplant (EBMT) Group. Abstract 56. Proceedings of the 22nd Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation.** Vienna, March 3-7, 1996.
14. Carella AM et al: High-dose chemo-radiotherapy followed by autologous Philadelphia chromosome-negative blood progenitor cell transplantation in patients with chronic myelo-genous leukemia **Bone Marrow Transplantation**, 17, 201-205; 1996.
 15. Reiffers J, Taylor K, Gluckman E, Gorin N, Carella A, Restree D, Gautier L. Ph negative blood progenitors cells can be successfully collected with lenograstim in patients with Chronic Myeloid Leukemia (CML) good responders to alfa-Interferon (alfa-IFN). Abstract 61. **Proceedings of the 22nd Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation.** Vienna, March 3-7, 1996.
 16. Archimbald F, Michellet M, Philip L, Sebban C, Guilhot F, Fiere D. G-CSF (Filgrastim) added to interferon-alfa (IF) to mobilize peripheral blood stem cells (PBSC) for autologous transplant in chronic myeloid leukemia (CML). Abstract 62. **Proceedings of the 22nd Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation.** Vienna, March 3-7, 1996.
 17. Johnson RJ. et al. Autologous transplantation for CGI. using Philadelphia negative stem cells mobilized with hydroxiurea and G-CSF. **Proceedings of the 4th International Symposium on Blood Cells Transplantation.** Adelaide, Australia, March 1996.
 18. Carella AM. Mobilization/Transplantation of Phi-negative Blood Progenitor Cell in Chronic Myelogenous Leukemia. **Autologous Bone Marrow Transplantation Newsletter.** N. 13/ December 1996.
 19. Goldman J. Comunicación personal.