

Movilización de Células Progenitoras Hematopoyéticas de Sangre Periférica



REVISION

Dr. Leandro Riera
Dr. Benjamín Koziner

Unidad de investigaciones Oncobematológicas «Nelly Arrieta de Blaquier» y
Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas «Norberto Quirno» (CEMIC)

HEMATOLOGIA, Vol. 2 N° 3: 93-108
Septiembre - Diciembre

INTRODUCCION

La administración de regímenes mieloablativos compuestos por altas dosis de quimioterapia +/- irradiación corporal total con el soporte de células hematopoyéticas autólogas, se ha convertido en una práctica rutinaria en la estrategia terapéutica de una variedad de neoplasias hematológicas y tumores sólidos¹. El fundamento de esta modalidad se basa en la relación bien establecida entre intensidad de dosis de quimioterapia y citotoxicidad tumoral²⁻³, confiando en la capacidad de las células progenitoras autólogas reinfundidas para revertir la mielosupresión universal asociada a estos tratamientos agresivos.

El origen de las células hematopoyéticas pluripotenciales utilizadas en procedimientos de trasplante autólogo se ha diversificado en años recientes, incluyendo no sólo a aquellas provenientes de la médula ósea (MO) en estado basal, sino también a células precursoras de sangre periférica (CPSP) estimuladas o "movilizadas" por el efecto de quimioterapia mielosupresora y/o factores estimulantes únicos o en combinación, administrados en forma simultánea o secuencial⁴.

En este trabajo nos proponemos revisar algunos aspectos relacionados a la biología de las células progenitoras hematopoyéticas y los métodos reportados para su obtención, con el fin de garantizar la recuperación de la hematopoyesis luego de tratamientos intensivos. Para este análisis se tendrá en suma consideración las características clínicas del paciente así como el diagnóstico y el estado evolutivo de la enfermedad, además de otras variables pronósticas que afecten el resultado del procedimiento de movilización celular.

CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS DE LAS CELULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS

Las técnicas de cultivo celular en medios líquidos y semi-sólidos y el reconocimiento progresivo de los mediadores humorales de la proliferación y diferenciación celular han modificado en forma radical el concepto de que la célula madre o «stem» representa un tipo único de célula inmortal.

Actualmente se considera que las células «stem» pueden ser mejor definidas como elementos pluripotenciales, transplantables, con capacidad replicativa variable, que se encuentran sujetas a cambios en su capacidad de diferenciación, supuestamente por interacciones no suficientemente reconocidas con factores y elementos del microambiente en el que se encuentran.⁵

La autorrenovación es una propiedad que se atribuye clásicamente a las células «stem». Si se la entiende como un proceso en el cual la división celular da origen a dos células hijas idénticas a la progenitora, desde todo punto de vista la autorrenovación en sentido estricto posiblemente no exista. De hecho, la pérdida de DNA telomérico y los cambios evolutivos en tales células son difíciles de compatibilizar con una verdadera autorrenovación⁶, aunque permite satisfacer los requerimientos de producción de células hematopoyéticas durante toda la vida en un individuo normal. Ante lo expuesto surge el cuestionamiento acerca de cuántas divisiones celulares se requieren para cubrir las necesidades de células maduras de sangre periférica durante toda la vida. En teoría se requiere un número relativamente modesto, posiblemente menor a 100.⁷

Otros autores sugieren que esta cantidad asciende a más de 5.000 divisiones celulares.⁸ Con respecto al «comportamiento» de las células «stem», en todo momento éstas se encuentran en condiciones de elegir entre producir células progenitoras diferenciadas o reservarse para cubrir requerimientos futuros procediendo a su autorrenovación.

Los intentos para regular el accionar de las células progenitoras más inmaduras con las citoquinas actualmente identificadas han fracasado invariablemente.^{9,10} Aparenta en consecuencia, que el papel primordial de las citoquinas respecto de la biología de las células progenitoras es proveer un ambiente adecuado para su supervivencia, proliferación y diferenciación.

El compromiso de una célula progenitora a desarrollarse en una determinada línea hematopoyética parece ser irreversible y no factible a ser alterado por la acción de los factores de crecimiento. La inserción del receptor de eritropoyetina en precursores de macrófagos de médula ósea o hígado fetal permite a la eritropoyetina estimular la formación de colonias de macrófagos, pero no de células eritroides.¹¹ Por otro lado la inserción del receptor del factor estimulante de colonias macrófago (M-CSF) en precursores eritroides permite al M-CSF estimular la formación de colonias eritroides puras.¹² En el momento actual el peso de la evidencia disponible sugiere que los factores que regulan el desempeño de la célula progenitora son intrínsecos. Como ejemplo se reconocen la sobreexpresión de algunos genes y activación secuencial de factores de transcripción nuclear, tales como SCL/TAL-1 y LMO₂, luego involucrando a otros factores de transcripción con restricción de linaje como GATA-1 o PU-1. Sin embargo, se desconocen los estímulos extrínsecos responsables de la activación de estos factores de transcripción.¹³ Aunque experimentos de reclonación en blastos, en división o en células formadoras de colonias multipotenciales han demostrado que el compromiso para diferenciarse de acuerdo a un cierto linaje celular es un evento asimétrico y que no sigue un patrón secuencial estructurado.¹⁴ Esto no significa que estos procesos no puedan ser influenciados por mensajes provenientes del entorno. Cuando la progenie de precursores bipotenciales granulocíticos-macrocíticos fueron expuestos en cultivo al efecto de diferentes reguladores hematopoyéticos, como factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) o M-CSF, la diferenciación celular fue influenciada en forma significativa por el factor estimulante utilizado.^{15,16}

Experimentos utilizando receptores mutados o truncados para G-CSF, trombopoyetina y GM-CSF han identificado una región C-terminal cuya pérdida o reducción funcional resulta en fallo para suprimir la autorrenovación en células leucémicas o fallo para inducir maduración en células leucémicas o inmortalizadas en cultivo. Sin embargo, el análisis de diferentes líneas celulares leucémicas sugiere que la

región que codifica la supresión de la autorrenovación no necesariamente es el mismo que el que determina la maduración celular, argumentando que estos procesos pueden diferir en cuanto a los mensajes requeridos para su implementación en diferentes tipos celulares.¹⁷

Otro aspecto de relevancia respecto de la biología de las células progenitoras es la correlación entre el acortamiento telomérico y la capacidad replicativa de las células. Se ha postulado que la pérdida de secuencias de telómeros en células hematopoyéticas, incluyendo las progenitoras, indica un potencial de replicación limitado. Sin embargo, también se ha comprobado que la presencia de telomerasa, cuya actividad se ha demostrado en células progenitoras, estabiliza los telómeros y extiende la vida replicativa de las células «stem».¹⁸

La actividad de la enzima es claramente muy baja en las células hematopoyéticas más primitivas quiescentes CD34+/CD38- y está marcadamente expresada en células más maduras CD34+/CD38+.¹⁹ Por último, independientemente de la presencia de telomerasa detectable, se ha observado acortamiento de los telómeros en linfocitos y en células progenitoras hematopoyéticas. En general los telómeros se acortan con la edad en humanos y esto parece relacionarse con la capacidad replicativa celular.²⁰ Esto podría ser particularmente relevante cuando se utilizan las células progenitoras de adultos para ser infundidas en niños, ya que desde un punto de vista teórico, estas células podrían tener parcialmente extenuada su capacidad de replicación poniendo en peligro el mantenimiento de la hematopoyesis a largo plazo en un individuo con una extensa expectativa de vida. Sin embargo la experiencia clínica indica que los productos de células progenitoras, tanto de médula ósea como de sangre periférica, en general producen una reconstrucción hematopoyética duradera.

No puede dejarse de mencionar por su significancia funcional las interacciones de adhesión entre los progenitores hematopoyéticos y el estroma del microambiente medular. Las células primitivas progenitoras exhiben una extensa gama de moléculas de adhesión (CAM) que incluye integrina, selectina, CD 44 y la super familia de inmunoglobulinas. Los ligandos para muchas de estas moléculas están expresados en las células estromales de la médula ósea.^{21,22,23} En particular, estudios recientes han puntualizado la importante contribución de la beta-1 integrina VLA-4, cuyos 2 ligandos fibronectina y VCAM-1 están expresados constitutivamente por el estroma medular.^{24,25} Existe documentada evidencia sobre la influencia de las CAM en el proceso de movilización celular, como p.ej. 1) células CD34+ movilizadas por una variedad de regímenes y citoquinas han demostrado consistentemente expresión reducida de ciertas CAM, en particular VLA-4, LFA-1 y LFA-3²⁶ y 2) luego de tratamiento con una variedad de citoquinas que incluyen la interleuquina-3,

GM-CSF y stem cell factor (SCF) se ha observado **aumentos** transitorios y dependientes de la dosis de la **capacidad** de adhesión de los ligandos de VLA-4 y VLA-5, **seguido** rápidamente por el retorno al estado de **activación** basal.²⁷ Estas observaciones sugieren que, por lo **menos** en parte, la movilización de células **progenitoras** hematopoyéticas es resultado del efecto de citoquinas en la función de integrinas en células CD34+ que facilita su egreso de la médula ósea.

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LAS CPSP

La presencia de células hematopoyéticas pluripotenciales en sangre periférica fue sugerida por primera vez por A. Maximow en 1909, quien postuló que entre los linfocitos hay células pequeñas que circulan por todo el organismo y tienen multipotencialidad.²⁸ Desde entonces persistió controversia hasta 1962, cuando se demostró en forma definitiva que las células «stem» son residentes permanentes de la sangre periférica como parte de la población de células mononucleares.²⁹

En estado basal la sangre periférica contiene muy limitada cantidad de células progenitoras (1-2 logs, menos que la médula ósea).³⁰ Sin embargo durante la recuperación hematológica de la hipoplasia medular inducida por quimioterapia puede rescatarse una gran cantidad de CPSP.³¹ Con el advenimiento de los factores de crecimiento hematopoyético, especialmente G-CSF y GM-CSF, se comprobó que éstos también eran capaces de movilizar células progenitoras, aumentando su presencia en sangre periférica 50-100 veces.^{32,33} Más aún, la combinación de quimioterapia y factores de crecimiento hematopoyético produce una movilización todavía mayor de células «stem» hacia sangre periférica.^{33,34}

Varios modelos experimentales en animales han demostrado la factibilidad del trasplante autólogo con CPSP. Sin embargo los resultados clínicos de los intentos iniciales en humanos fueron variables hasta que a principios de los 80 y definitivamente a partir de 1985, varios grupos demostraron que las CPSP autólogas adecuadamente recolectadas y transfundidas luego de quimio-radioterapia mieloablativa reconstituyen todas las líneas celulares hematopoyéticas.³⁵

Además se comprobó que estas CPSP proporcionan una recuperación hematológica significativamente más precoz que las procedentes de médula ósea, debido a que las células mononucleares movilizadas contienen un número relativamente elevado de precursores hematopoyéticos comprometidos a las distintas líneas celulares además de las células pluripotenciales. Esto abrevia los períodos de internación reduciendo los requerimientos transfusionales, el uso de antibióticos etc., con un impacto positivo en el costo del trasplante.³⁶

Todos estos progenitores en diferentes estadios de diferenciación expresan en su superficie la glicoproteína CD34.³⁷ Este hallazgo ha convertido al CD34 en un

marcador conveniente y confiable para establecer el número de células «stem» dentro de la población de células mononucleares obtenidas por leucoféresis. Mientras que en condiciones basales sólo 0,1% de la población mononuclear de sangre periférica es CD34+, luego de la movilización con quimioterapia este porcentaje aumenta considerablemente.^{38,39}

Las células mononucleares CD34+ están compuestas por subpoblaciones de células con mayor o menor grado de diferenciación. La mayoría, aproximadamente 75%, coexpresan CD13 o CD33 sugiriendo diferenciación mieloide. También expresan CD38, antígeno que se encuentra en la mayoría de las células granulocíticas. Un número significativo expresa antígenos megacariocíticos CD41 y CD61 y, finalmente, un alto porcentaje son positivas para CD71 señalando diferenciación eritroide. Por otra parte, los progenitores inmaduros B y T están presentes en número variable dentro de las células mononucleares movilizadas. Una pequeña fracción de células, posiblemente menor a 5% de la población CD34+ son además CD33-, CD38- y aún HLA-DR -, representando probablemente un grupo de progenitores muy inmaduros. Estos elementos, debido a su capacidad de autorrenovación son los responsables de la reconstitución hematopoyética a largo plazo luego del autotrasplante con CPSP.⁴⁰

La International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) ha propuesto pautas metodológicas para la estandarización del recuento de células CD34 por citometría de flujo en sangre periférica y en los productos de aféresis. Fue establecido que las células CD34+ verdaderas: a) expresan el antígeno CD34, b) demuestran el antígeno CD45 con la intensidad característica de blastos, fácilmente reconocible pero a niveles menores que en linfocitos y monocitos y c) exhiben bajo patrón de dispersión lateral y bajo a intermedio patrón de dispersión característico de blastos. El patrón de dispersión lateral y frontal de células CD34+ es levemente más alto que los observados en linfocitos.⁴¹ Pecora y col.⁴² y Millar y col.⁴³ han propuesto que el recuento de células CD34+ CD33- es un parámetro más compatible para predecir la recuperación hematológica, sobre todo de plaquetas que el número total de células CD34+, consistente con las recomendaciones del ISHAGE mencionadas más arriba.

El método de detección de células iniciadoras de cultivo a largo término (LTC-IC) que identifica progenitores auto renovables capaces de iniciar y sostener hematopoyesis en por lo menos 5 semanas en cultivo a largo término, ha sido utilizado en sangre periférica en estado basal y luego de movilización. Es considerado como el análisis funcional más eficiente para cuantificar el contenido de células precursoras en sangre movilizada.⁴⁴ Sin embargo, ciertos requerimientos metodológicos deben cumplimentarse

para su estandarización y utilización clínica como la selección del estroma de soporte, diluciones limitantes y tiempo de cultivo no menor a 5 semanas.⁴⁵

METODOLOGÍA DE LA RECOLECCIÓN DE CPSP

La recolección de CPSP comienza con la colocación de un acceso venoso de doble lumen generalmente de introducción subclavia de calibre adecuado como los usados en procedimientos de diálisis. Durante una serie de sesiones de aféresis de duración variable (generalmente 4 horas para un volumen de 10 litros) se extraen células mononucleares que serán luego criopreservadas de acuerdo a una metodología similar a la utilizada para médula ósea.

El procedimiento de recolección de CPSP se realiza por medio de separadores celulares. Todos los equipos disponibles comercialmente pueden ser usados para la recolección de células progenitoras de sangre periférica.

Una buena máquina para este fin debe:

1. Ser fácilmente transportable
2. Ser de flujo continuo o discontinuo capaz de operar con un acceso venoso único
3. Operar con la sangre y sus componentes en circuito cerrado
4. Trabajar con un volumen extracorpóreo pequeño, para poder usarse en pediatría
5. Ser automáticos y computarizados para conseguir la colección de células mononucleares con la menor contaminación posible
6. Dar un producto final de pequeño volumen

Diversos separadores se han usado para estos fines.

En el pasado se usaron el Aminco o la Haemonetics 30. Otros como la Cobe 2997 o la Dideco Vivacell todavía se usan, aunque la calidad del producto con estos se correlaciona con la precisión de ajustes visuales y manuales y la contaminación con células no deseables es frecuente. Con los separadores de 3ra. generación el producto obtenido es mucho más puro al usar un sistema automático. Los principales son: la CS 3000 y CS 3000 plus de Baxter, Haemonetics V 50, Cobe Spectra, Fresenius AS 104 y Excel de Dideco.

El efecto secundario más común del procedimiento es adormecimiento perioral y parestesias secundarias a la hipocalcemia causada por el anticoagulante. Estos síntomas pueden ser prevenidos con una ingesta alta en calcio durante el o los días de aféresis. Otros efectos secundarios potenciales incluyen hipotensión, infección o trombosis del cateter.

La mayor dificultad inherente a la utilidad de las técnicas de movilización celular reside en la determinación del momento ideal para el comienzo de las recolecciones de células precursoras de sangre periférica. Se han propuesto diferentes criterios basados en el aumento progresivo de leucocitos, neutrófilos, monocitos, reticulocitos, plaquetas, células CD34+ o colonias CFU-GM o BFU-E por encima de ciertos niveles.

Básicamente, las posturas se han dividido entre aquéllas que cualitativamente utilizan la salida temprana de precursores hematopoyéticos luego de quimioterapia mielosupresora \pm CSF ($>500-1000$ neutrófilos, >50000 plaquetas), y aquéllas que cuantitativamente prefieren la recolección con números elevados de precursores mieloides ($>5-15 \times 10^3$ /ul) sobre todo luego del uso de CSFs, en un intento de amplificación *in vivo*. Este último enfoque tiene el inconveniente de diluir la fracción pluripotencial circulante en sangre periférica con células diferenciadas, como neutrófilos y monocitos. Esto hace más dificultosos los procesos de aféresis requiriendo la criopreservación de grandes volúmenes de suspensión celular con su impacto en la economía del procedimiento y la reinfusión de cantidades excesivas de DMSO y material celular con capacidad de producir complicaciones a nivel pulmonar y renal.⁴⁶

REQUERIMIENTOS DEL PRODUCTO CELULAR PARA AUTOTRASPLANTE

En base a lo expuesto, se desprende que el producto de CPSP obtenido por leucoféresis debe reunir algunas características indispensables.

La primera y fundamental es contener un número de progenitores que garanticen una reconstitución hematopoyética no sólo inmediata sino también a largo plazo. La cantidad mínima de células "stem" necesarias no se ha establecido. Aunque se han realizado procedimientos exitosos infundiendo 0.5×10^6 /kg de células CD34+⁴⁷ o aún menos, parece prudente asegurar un contenido de células CD34+ mayor a 5×10^6 /kg. Las determinaciones de la celularidad total del producto o de células mononucleares no son aconsejables como únicos indicadores para establecer el contenido de progenitores hematopoyéticos, ya que en forma aislada tienen una correlación pobre con la dinámica del injerto,^{47, 48} pero son útiles si se combinan con la determinación de CD34. En este sentido, valores superiores a 10×10^8 /kg de células nucleadas totales y 7.8×10^8 /kg de células mononucleares, se consideran suficientes para garantizar la recuperación hematológica. Se ha propuesto un valor superior a 2×10^4 /kg de LTC-IC para autotransplante de células progenitoras periféricas similar al infundido con médula ósea, aunque la reconstitución hematológica se ha observado con valores muy inferiores al propuesto.⁴⁵

El segundo aspecto de importancia es la probable o real contaminación del producto con células tumorales. Merece destacarse que la recolección de CPSP disminuye pero no anula el riesgo de reinfusión de células malignas. Aún sin evidencia morfológica, la presencia de células clonogénicas tumorales en circulación puede inferirse por métodos indirectos en una proporción no despreciable. El exceso clonal consistente en una proporción excesiva de una población que expresa una determinada cadena liviana (κ o λ) al igual

que la expresión idiotípica de inmunoglobulina de superficie con iguales características a la paraproteína monoclonal circulante, son datos sugestivos de enfermedad mielomatosa presente en sangre periférica.⁴⁹ Un marcador de utilidad clínica para el reconocimiento de enfermedad mínima residual en linfomas de bajo grado es el oncogen BCL-2, la contrapartida molecular de la traslocación cromosómica t(14;18).^{50,51,52}

Se argumenta que las CPSP están menos contaminadas por células neoplásicas residuales que la MO y por tanto el riesgo de recaída tras el trasplante es menor. Sin embargo, todavía no hay evidencia convincente al respecto.^{50,53} Hasta el presente pocos son los trabajos que han evaluado la presencia de células neoplásicas en las CPSP recolectadas utilizando fundamentalmente inmunocitología o cultivos celulares a largo plazo (LTC-IC) para tal fin. Moss y col⁵⁴ en pacientes con neuroblastoma encuentran contaminación en el 75% de muestras al momento del diagnóstico, 36% durante el tratamiento y 15% en la recolección. Estos investigadores concluyen que existe riesgo de contaminación a pesar de que haya o no infiltración de la médula, por lo que la recolección debe realizarse tras tratamiento de inducción y sugieren que lo recolectado puede estar libre de contaminación tras el segundo ciclo de inducción.

En carcinoma de mama se ha reportado la detección positiva por inmunocitoquímica y/o citometría de flujo de células cancerosas reconocidas por un panel de anticuerpos monoclonales en 10% de las suspensiones de CPSP estudiadas.^{55,56} Sin embargo en un estudio publicado por Brugger y col,⁵⁷ se demostró la capacidad potencial de los métodos de movilización de CPSP de reclutar células tumorales sobre todo en estadio IV de carcinoma de mama de implicancia en la inducción de recaída neoplásica.

Actualmente se están marcando genéticamente las células leucémicas. Los retrovirus se adaptan a ello por la eficiente liberación de su genoma en las células, con integración en el genoma del huésped y el alto nivel de expresión en sus secuencias internas. Para estudiar la presencia de enfermedad mínima residual se ha usado un vector retroviral que codifica E. coli Lac Z y el gen de resistencia a la neomicina (neoR). Estos genes fueron exitosamente integrados en el DNA de células LT12, y las líneas celulares leucémicas fueron clonadas y expandidas.⁵⁸

Las estrategias de movilización incluyen el uso de quimioterapia, factores de crecimiento hematopoyético, aisladamente o en combinación y la asociación de ambos. Aunque el método óptimo de movilización aún no se ha establecido, todas estas estrategias han sido exitosas.^{59,60,61} El uso de quimioterapia como movilizador de células «stem» ha sido extensamente estudiado. La ciclofosfamida es posiblemente la droga con la que más experiencia existe. Se la ha usado en distintas dosis, aunque en general oscilan entre 3g/m² y 7g/m², siempre

asociada a factores de crecimiento. No ha habido diferencias significativas en cuanto a la cantidad de células CD34+ obtenidas ni en cuanto a la evolución del trasplante, pero sí en cuanto a la toxicidad de uno y otro régimen.⁶² También se han logrado recolecciones exitosas utilizando dosis estándar de quimioterapia asociadas a G-CSF.⁶³ Por último, los regímenes de salvataje utilizados en pacientes recaídos o con enfermedad progresiva también han demostrado ser movilizadores eficientes asociados a G-CSF.^{64,65}

Respecto al uso de factores de crecimiento hematopoyético, sin quimioterapia previa, se han utilizado GM-CSF y/o G-CSF, aunque este último factor parecería ser más eficiente en la expansión del sistema hematopoyético y carecer de los efectos secundarios asociados al mencionado primero. Aunque desde el punto de vista biológico se han señalado diferencias entre la forma glicosilada y no glicosilada de G-CSF, la comparación inmunofenotípica y clínica de productos celulares movilizados no ha demostrado diferencias significativas.⁶⁶

Spitzer y col.⁶¹ reportaron su experiencia en 50 pacientes con linfonos y tumores sólidos movilizados con G-CSF a 10 ug/Kg/día (grupo 1) o G-CSF 5ug/Kg/día combinada con GM-CSF 5ug/Kg/día (grupo 2). Los pacientes fueron tratados durante 5 días. Ningún paciente recibió factores de crecimiento después de la infusión, salvo que al día +18 su recuento de neutrófilos fuera menor de 100/mm³. No hubo diferencias significativas en cuanto al número de células «stem» recolectadas, ni en cuanto a la evolución clínica de los pacientes, aunque G-CSF aisladamente pareció levemente superior a la combinación de G-CSF y GM-CSF en este estudio y en otros.⁶⁷ Indudablemente, el uso de factores de crecimiento es una alternativa válida para movilización de células «stem» e incluso tiene algunas ventajas respecto de la quimioterapia, ya que evita la neutropenia y trombocitopenia producidas por la quimioterapia y permite programar el momento de la leucoféresis especialmente en pacientes que no hayan sido intensamente tratados con quimio y/o radioterapia previas.

La cantidad de progenitores hematopoyéticos contenidos en el producto, definida fundamentalmente por el número de células CD34+, es considerada el mejor predictor de la velocidad de recuperación hematológica, luego de las altas dosis de quimioterapia.⁴⁰ Cuando el número de células CD34+ infundidas es superior a 2.5x10⁶/Kg casi todos los pacientes experimentan una rápida recuperación de neutrófilos y plaquetas. Sin embargo, existe un período obligado de mielosupresión de 8-10 días requerido para que los progenitores se diferencien a elementos maduros que no puede abreviarse aumentando la cantidad de células CD34+ infundidas.⁴⁸

En consecuencia, si se acepta este concepto, recolectar una cantidad excesiva de CPSP no se traduce

en beneficio clínico directo en cuanto a la recuperación del trasplante, y sí en cambio podría aumentar la contaminación del producto con células tumorales, especialmente si se prolongan demasiado las leucoféresis, procesando grandes volúmenes o se realizan un número aumentado de procedimientos.⁶⁸

Es anticipable que en un futuro próximo las células puedan provenir de la extracción de un limitado volumen de médula ósea y/o sangre periférica adecuadamente expandidas en el laboratorio por citoquinas, eliminando las limitaciones técnicas existentes en la actualidad para la extracción, conservación y reinfusión de este material.

La posibilidad de seleccionar, concentrar y expandir la población precursora hematopoyética multilínea parece haberse concretado con el advenimiento de métodos inmunofísicos que utilizan la separación positiva de las células «stem» que exhiben el antígeno CD34 en la superficie celular.⁶⁹ La exposición *in vitro* de esta población seleccionada a combinaciones de diferentes factores estimulantes y citoquinas, resulta en la amplificación considerable del número y la proporción de células potencialmente capaces de proliferar y diferenciarse siguiendo diferentes líneas de crecimiento hematopoyético.

La expansión *in vitro* de CPSP es un método atractivo y racional para mantener la cantidad y calidad de estas células para una reconstitución hematopoyética exitosa completa y sostenida luego de terapia mielosupresora intensa y TAMO. Una creciente experiencia experimental clínica avala esta estrategia.^{70, 71, 72, 73, 74} Haylock y col obtuvieron una expansión de CFU-GM 66 veces superior a la basal luego de amplificación *in vitro* de CPSP con 6 factores de crecimiento IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF y stem cell factor recombinante.⁷¹

Stiff y col han reportado recientemente una serie de 16 pacientes con cáncer de mama avanzado sometidos a quimioterapia a altas dosis con el régimen STAMP V e infundidos con 40 ml de médula ósea autóloga expandida en un bioreactor AASTROM CPS. Este dispositivo automatizado que utiliza estroma e intercambios frecuentes de medios de cultivo y gases bajo estimulación con la combinación del PIXY (GM-CSF/IL3), ligando del flt3 y eritropoyetina, resultó en la expansión de 4.9 veces el número de células y 22.5 veces el número de CFU-GM iniciales y un aumento del 23% en LTC-IC durante la incubación. Las medianas de recuperación de neutrófilos >500 y de plaquetas >20.000 fueron de 16.5 y 23.5 días, respectivamente.⁷⁵

FACTORES PREDICTIVOS DE LA CALIDAD DE LA MOVILIZACIÓN DE CPSP

A pesar del progreso significativo que se ha logrado en los métodos de movilización y recolección de CPSP, existe todavía un grupo de pacientes en los cuales la celularidad obtenida es baja. Un movilizador pobre se

define como aquel que luego de repetidas leucoféresis no alcanza un umbral ideal de 5×10^6 células CD34+/Kg. La mayor parte de los autores coinciden en que si luego de 3 recolecciones no se ha llegado a 1×10^6 células CD34+/Kg, debe considerarse que la movilización ha fracasado, ya que procedimientos adicionales no ofrecen beneficio alguno.

Si bien los datos que se disponen respecto a los factores que afectan la movilización y recolección de células «stem» son escasos, hay algunos factores predictivos sobre los que existe un cierto consenso. Estos factores serían: el esquema de movilización utilizado, el tipo y estado de la enfermedad de base, el número de recaídas, el número de ciclos y de esquemas de quimioterapia recibidos sobre todo con drogas que lesionan a las células «stem» (especialmente melfalán), el uso de radioterapia extensa y la edad del paciente. Todos estos factores influyen en forma negativa la cantidad de progenitores movilizados.^{48, 76, 77, 78} Por lo tanto en aquellos pacientes con factores predictivos de pobres movilizaciones es conveniente ensayar un esquema de movilización agresivo. Los esquemas de quimioterapia de segunda línea tales como ESHAP, ICE o IVE⁶⁴ son excelentes movilizadores, especialmente si se asocian a factores de crecimiento en dosis considerablemente más altas a las habituales.

PROGRAMAS DE MOVILIZACIÓN PARA DIFERENTES PATOLOGÍAS

A. LINFOMAS NO HODGKIN (LNH), ENFERMEDAD DE HODGKIN (EH)

La ciclofosfamida (CFM) en dosis intermedias o altas, asociada a G-CSF o GM-CSF, ha sido la droga más utilizada para la movilización de CPSP, tanto en LNH como en EH. Se la ha administrado a pacientes con enfermedad precoz, así como con enfermedad avanzada, en recaída o con enfermedad progresiva.

Con esta estrategia, aunque la mayor parte de los pacientes logran una movilización adecuada y es posible recolectar suficiente cantidad de CPSP, se ha observado una proporción de pacientes que fallan a la movilización, llegando en algunas series al 40% de los casos⁶⁴ requiriendo más procedimientos de leucoféresis o ser removilizados. Por otra parte, estos dos factores aumentan la contaminación tumoral del producto.⁷⁹ La CFM en dosis de 3 a 7 g/m², que son las habitualmente usadas, tiene toxicidad definida, con episodios de neutropenia y fiebre, sepsis, cardiotoxicidad, cistitis hemorrágica y una mortalidad de 1-2%.^{60, 80} En pacientes con enfermedad avanzada o progresiva, su contribución en cuanto a efecto anti-linfoma usada como monodroga, es relativo. En pacientes con enfermedad limitada, la quimioterapia convencional asociada a G-CSF ha demostrado tener igual capacidad de movilización de células progenitoras.^{63, 64, 65} Tampoco la CFM ha sido

superior como movilizador a los esquemas de quimioterapia de salvataje habitualmente usados en pacientes recaídos o con enfermedad progresiva.^{64,81}

Si se toman en cuenta estas consideraciones, parecería quedar poco espacio para el uso de CFM como quimioterapia de preferencia para movilización de CPSP en linfomas.

Tal vez una estrategia aceptable sería: en pacientes con LNH/EH con signos de mal pronóstico (IPI mayor de 3 u otros marcadores), en quienes se plantee realizar trasplante autólogo como consolidación de la quimioterapia convencional,⁸² utilizar ese esquema de quimioterapia de primera línea en dosis estándar como movilizador asociado a G-CSF 10µg/Kg/día, en dos aplicaciones diarias, vía SC (5µg/Kg/cada 12 hs) comenzando el día +5 post quimioterapia y continuando hasta finalizar la recolección. En pacientes con enfermedad progresiva o recaída, usar como movilizador de CPSP el esquema de quimioterapia de salvataje que resulte más adecuado (DHAP, ESHAP, ICE, IVE, etc.), asociado a G-CSF con la misma dosificación descrita arriba.

Los pacientes con LNH de bajo grado sometidos a altas dosis de quimioterapia y trasplante autólogo de CPSP son, por lo general, pacientes con enfermedad avanzada que han recibido más de un esquema de quimioterapia previo y frecuentemente radioterapia. Estos pacientes suelen tener enfermedad de larga evolución y posiblemente hayan sufrido daño iatrogénico de células «stem», demostrando, habitualmente, factores predictivos de movilización pobre. Además, aunque la médula ósea no se encuentre visualmente comprometida por linfoma, la contaminación del producto suele ser alta. Por estas razones, en estos pacientes parece adecuado una estrategia de movilización agresiva, con esquemas de quimioterapia tipo ESHAP + G-CSF, que proporcionan una razonable certeza en cuanto a su poder movilizador, tengan un efecto anti-linfoma claro y no produzcan resistencia cruzada con las drogas que posteriormente se usarán en el régimen de condicionamiento mieloablativo. Otras propuestas alternativas serían la recolección de CPSP al momento del diagnóstico si no se demuestra infiltración de médula ósea morfológica o esperar un período de 6 meses post-quimioterapia para movilizar pacientes en remisión.⁸³

B. MIELOMA MULTIPLE (MM)

Los pacientes con mieloma múltiple son los que con mayor frecuencia presentan dificultades para una movilización y recolección exitosas de CPSP, especialmente si han de ser sometidos a un doble trasplante autólogo.

Aunque el régimen óptimo de movilización no ha sido establecido, también en esta entidad se ha considerado generalmente, que la CFM en dosis

intermedias o altas (3-7 g/m²) en combinación con factores de crecimiento hematopoyético, es el mejor esquema para recolectar un alto número de progenitores que permitan una rápida recuperación post-trasplante autólogo.^{84, 85} Esto es particularmente aplicable en pacientes con menos de 24 meses de tratamiento previo.

La popularidad de la CFM en este aspecto se debe a que permite recolecciones adecuadas sin dañar las células progenitoras.⁸⁶ Sin embargo es conveniente considerar algunos puntos referidos a su eficacia movilizador de CPSP, además de la toxicidad hematológica y en otros parénquimas observada a las dosis utilizadas, sobre todo 7 g/m², que es la dosis que garantiza una mayor movilización de progenitores CD34+. Cuando se utiliza luego de 3 ciclos de VAD en pacientes con mieloma múltiple recientemente diagnosticado y que recibieron ese esquema como primera línea, su efecto anti-mieloma parece limitado. En la experiencia de Barlogie y col. incrementa sólo en 4% y 20% respectivamente las remisiones completas y parciales.⁸⁶ Por otra parte, en pacientes con enfermedad avanzada, que generalmente presentan factores predictivos de mala movilización, enfermedad habitualmente resistente y gran masa tumoral, parecería más adecuado utilizar un esquema de movilización que, además de proporcionar una cantidad suficiente de CPSP, tenga un efecto anti-mieloma definido que permita afrontar el trasplante autólogo con la menor masa tumoral posible. Finalmente, en algunos pacientes con considerable exposición a drogas que dañan a las células «stem», como melfalán p.e., la movilización con quimioterapia agresiva inicialmente, puede no ser la mejor opción, ya que eventualmente puede producirse una disminución aún mayor en la reserva de células progenitoras, fracasando la movilización. Además puede producirse daño de los elementos del estroma medular que hagan fracasar el injerto.⁸⁷

Es sabido que los pacientes con tumores sólidos o linfoma movilizan mejor que quienes presentan mieloma múltiple. Los factores predictivos de mala movilización son: el estado de la enfermedad de base, el régimen de movilización utilizado y especialmente el número de ciclos y esquemas de quimioterapia previos, en particular, el uso de melfalán. Se ha demostrado que el melfalán produce daño permanente de las células «stem», rápida depleción de progenitores e interfiere con la movilización.^{88,89}

En un análisis retrospectivo de 225 pacientes con mieloma múltiple, que incluyó a 57 pacientes mayores de 60 años movilizados con CFM 6 g/m² y GM-CSF, no se observaron diferencias en el número de células CD34+ recolectadas o en el intervalo transcurrido luego de la infusión hasta la recuperación hematológica comparando diferentes grupos etarios (20-49, 50-59 y >60 años) si se tomó en consideración la duración de la quimioterapia previa.⁹⁰

Teniendo en cuenta estos aspectos, es necesario

plantear en qué momento se considera que un paciente ha fallado a la movilización, y una vez iniciada la recolección hasta cuándo se sigue con ésta para lograr el número de progenitores CD34+ requerido.

Pacientes con enfermedad precoz y sin factores pronósticos negativos, casi con seguridad movilizarán bien y se logrará una cosecha adecuada. Respecto de pacientes que reúnan factores predictivos adversos, sería prudente realizar una determinación de la cantidad de progenitores CD34+ en sangre periférica antes de comenzar la leucoféresis. Este recuento se correlaciona significativamente con el número de progenitores que se obtendrán y permite predecir con cierto margen de certeza el resultado de la leucoféresis. Se ha señalado que un recuento de CD34+ de $10/mm^3$ proporciona aproximadamente $0.5 \times 10^6/Kg$ en el producto por día de recolección.⁹¹ En consecuencia, debería contarse por lo menos con esa cantidad o preferiblemente más de $20/mm^3$ células CD34+ en sangre periférica para iniciar la aféresis. Ocurre además, que a diferencia de tumores sólidos y linomas, en días sucesivos de leucoféresis el número de células CD34+ disminuye y la recolección se empobrece. Por otra parte, a medida que aumenta el número de recolecciones también aumenta la contaminación tumoral del producto. Por tal motivo algunos autores aconsejan que, si con 5 recolecciones no se ha llegado al número de progenitores hematopoyéticos pretendido, se debe considerar una segunda movilización.⁹²

Tomando en cuenta las consideraciones previas, la estrategia de movilización y recolección de mieloma múltiple podría ser la siguiente: en primer lugar sería deseable movilizar a los pacientes precozmente en el curso de su enfermedad utilizando la quimioterapia convencional, preferiblemente VAD como primera línea de tratamiento. Luego del 4º ciclo de VAD, administrar G-CSF a dosis de $10 \mu g/Kg/día$, en dos dosis diarias, como dosis mínima.

En cuanto a pacientes con más de 12 meses de tratamiento y/o factores de pronóstico adversos existen, posiblemente, dos alternativas. Si el paciente ha recibido tratamiento prolongado con melfalán, se teme que la reserva medular de células «stem» se encuentre deteriorada y no se pretende reducir masa tumoral, el uso de quimioterapia puede comprometer la recolección y aún el injerto. En ese caso, G-CSF a dosis entre 10 y $30 \mu g/Kg/día$ en dos dosis diarias durante 5 días puede ser la mejor opción.⁹⁰ La segunda alternativa es la combinación de G-CSF ($5-10 \mu g/Kg/día/5$ días) y quimioterapia, por ejemplo CFM $4g/m^2$ + VP 16 $500 mg/m^2$.⁹²

En pacientes que fracasaron a una primera movilización, o no alcanzaron una cosecha de $5 \times 10^6/Kg$ de células CD34+ y/o $8 \times 10^8/Kg$ de CMN en 5 leucoféresis y deben ser removilizados, las opciones serían: 1) si fue movilizado con quimioterapia y factores de crecimiento, usar sólo factores de crecimiento en

dosis altas ($16-32 \mu g/Kg/día/5$ días).^{87, 93} 2) si fue movilizado con factores de crecimiento únicamente, removilizar con G-CSF en dosis altas o utilizar la combinación de quimioterapia y factores de crecimiento.

C. CANCER DE MAMA

En cáncer de mama es posible generalmente lograr una buena movilización y recolección celular con los esquemas de movilización convencionales, o sea factores de crecimiento (fundamentalmente G-CSF) solo o en combinación con quimioterapia. Como se ha señalado más arriba, los tumores sólidos movilizan mejor que las neoplasias hematológicas. Sin embargo se han descrito fracasos de movilización sobre todo usando G-CSF únicamente en 13% de una serie de 108 pacientes.⁹⁴

Aunque no hay tanto consenso como en MM o LNH, los factores predictivos de pobre movilización también parecen tener utilidad en cáncer de mama. Se incluyen los múltiples ciclos y esquemas de quimioterapia y radioterapia previos, enfermedad avanzada, compromiso de médula ósea y edad de la paciente.⁹⁵ Aunque otros autores consideran que estos factores predictivos no tienen influencia significativa,⁹⁶ se basan en la experiencia de 38 pacientes en los cuales se administró quimioterapia agresiva combinada con G-CSF como esquema de movilización, probablemente resultando en una alta movilización de progenitores y una mayor cantidad de células CD34+ en el producto.

Nuevamente aquí merece tenerse en cuenta, además de la cantidad de CPSP a recolectar, la posible contaminación tumoral del producto que se observa, sobre todo en casos de enfermedad metastásica. Cuando fue necesario un número mayor a 4 procedimientos de leucoféresis, se detectaron células tumorales en más del 40% de los productos, mientras que con 1 procedimiento el porcentaje fue de 5%.⁶⁸

Por lo tanto se podrían formular las siguientes recomendaciones que contemplen los aspectos señalados: 1) recolectar a los pacientes precozmente, 2) intentar recolectar el valor de células progenitoras pretendido con el menor número de aféresis posible (1 ó 2 leucoféresis sería ideal en este aspecto), 3) en casos de pacientes con enfermedad no metastásica, puede intentarse sólo G-CSF a $10 \mu g/Kg/día$ en dos dosis diarias luego del último ciclo de quimioterapia adyuvante en dosis estándar. Por otro lado, en pacientes con enfermedad metastásica, aunque puede lograrse una movilización exitosa sólo con factores de crecimiento, esta alternativa presenta dos inconvenientes: a) en primer lugar no tiene ningún efecto antitumoral y b) aparentemente movilizaría un gran número de células tumorales.⁹⁶ En estos casos, que son los de mayor masa tumoral y mayor riesgo de falla de movilización, parecería adecuado planear una estrategia agresiva de quimioterapia combinada con G-CSF que garantice una alta movilización de progenitores, reduzca la carga

tumoral y sea complementario del régimen de condicionamiento. En este aspecto han demostrado cumplir con estos requisitos: CFM 4g/m² + Etopósido 600 mg/m² en 3 días + Cisplatino 105 mg/m² en tres días + G-CSF⁹⁷, o CFM 2g/m² + Paclitaxel 175 mg/m² + G-CSF⁹⁴ o Paclitaxel 300 mg/m² en infusión de 24 hs + G-CSF.⁹⁷

Estas opciones tienen claro efecto anti-tumoral en casos de enfermedad quimiosensible y un gran potencial movilizador, permitiendo alcanzar más de 5x10⁶/Kg en dos procedimientos de leucoféresis.

MOVILIZACION DE CELULAS PROGENITORAS HEMATOPOYETICAS EN DADORES NORMALES.

El uso de CPSP en trasplante alogénico puede ofrecer las mismas ventajas que en trasplante autólogo, evitando la anestesia general del dador y permitiendo una recuperación hematológica e inmunológica más precoz del receptor. El esquema que se elija para la profilaxis de la enfermedad de injerto contra huésped, sobre todo la inclusión de metotrexato, puede ser fundamental para determinar la velocidad de desarrollo del injerto y por lo tanto debe ser tenida en cuenta para establecer el umbral de células progenitoras a infundir.^{98,99}

Varios grupos han comprobado los beneficios potenciales del uso de CPSP en trasplante alogénico y hasta el momento el peligro teórico de un aumento en la incidencia y severidad de la enfermedad aguda de injerto contra huésped debido al alto número de células T contenidas en el producto, no se ha observado.^{98,100,101,102}

Un área de especial interés en el trasplante alogénico con CPSP es la optimización de la movilización y la recolección de las células progenitoras a partir de dadores normales. G-CSF es actualmente el agente movilizador de elección, en razón de su eficacia y aceptable perfil de toxicidad que consiste en mialgias, dolores óseos y

retención hidrosalina.^{98,103} El uso de paracetamol (500 mg c/8-12 hs) permite controlar los síntomas, y en la experiencia de Waller y col.¹⁰¹ y de Roberts y col.,⁹⁹ ningún dador debió suspender la movilización debido a toxicidad. También en niños sanos donantes para trasplante alogénico se ha demostrado la seguridad y eficiencia de la movilización con G-CSF.¹⁰⁴

Aún no se ha establecido si existe toxicidad tardía a dosis altas de G-CSF. En este sentido existe preocupación sobre aspectos relacionados con la seguridad del procedimiento en dadores sanos¹⁰⁵ y la necesidad de pautar el uso del factor estimulante y establecer normativas de seguimiento para detección de potenciales efectos secundarios tardíos.¹⁰⁶ El mayor inconveniente para los dadores está vinculado a la necesidad de recurrir a catéteres venosos centrales en aquellos individuos con malos accesos venosos periféricos. Sin embargo, aproximadamente 60-70% de los dadores normales tienen venas periféricas adecuadas para leucoféresis.⁹⁹

La dosis y esquema óptimo de movilización de CPSP con G-CSF en dadores normales no está bien definida. Aunque en dosis de 3-5 µg/Kg puede inducir una movilización adecuada, los resultados suelen ser variables, y es por ese motivo que se aconseja emplear dosis iguales o mayores a 10µg/Kg/día. Aparentemente hay correlación entre la intensidad de dosis de G-CSF y la cantidad de progenitores movilizados. Dosis de 12 µg/Kg, 16 µg/Kg, 20 µg/Kg y aún 30 µg/Kg permiten recolecciones de cantidades crecientes de progenitores hematopoyéticos en una sola leucoféresis y con incremento tolerable de la toxicidad.^{98,99,101} (Tabla 1) También se ha sugerido que la división de la dosis en dos aplicaciones diarias con intervalos de 12 hs. es superior a una única aplicación diaria¹¹⁴ aunque no existe consenso respecto de este punto.⁹⁹ Sin embargo si se requiere utilizar dosis altas de G-CSF la administración repartida es necesaria por cuestiones prácticas.

Tabla 1. Obtención de Células Progenitoras en Donantes Normales Movilizados con G-CSF

Autor	Nº de donantes	Dosis de G-CSF µg/kg/d	Nº días G-CSF	Volumen de la leucoféresis por recolección (litros)	Cel. CD34+ x10 ⁶ per Kg (mediana o promedio)
Tanaka y col. ¹⁰⁷	5	125 µg/d	3, 4	8-10	1.5
Suzue y col. ¹⁰⁸	4	2	5	3	1.1
	5	5	5	3	1.8
Schmitz y col. ¹⁰⁹	6	10			3.6
	2	5, 7.5	4 ó 5	9-10	1, 3.9
Grigg y col. ¹¹⁰	4	3			0.65
	4	5	5	7	1.2
	7	10			4.6
Lane y col. ¹¹¹	7	10	4	10	1.7
Körbling y col. ¹¹²	9	12	3, 4, 5	2-3	3.6
Bensinger y col. ¹¹³	8	16	4, 5	10-12	6.6

También se ha prestado particular atención al momento de inicio de la recolección. Se observó que los niveles de células CD34+, CFU-GM y BFU-E disminuyen en sangre periférica, luego de la administración de G-CSF y alcanzan su nadir 1h. luego de la inyección, recuperando sus niveles basales a partir de las 3 hs. posteriores y continúan aumentando durante las siguientes 12 hs.

Estas variaciones se han comprobado especialmente para los progenitores CD34¹¹⁵. Si G-CSF se aplica al comienzo de la leucoféresis es probable que la cantidad de progenitores recolectados disminuya en 15-30%. En la mayoría de los donadores esto no sería clínicamente importante, salvo en dos circunstancias: a) movilizados pobres.¹¹⁶ Existe una amplia variación individual en cuanto a la capacidad de movilización de progenitores hematopoyéticos, aún en individuos normales, que se especula se debe a diferencias genéticas¹¹⁷, b) cuando se fija un umbral alto de CPSP a recolectar, por ejemplo cuando se va a realizar algún tipo de manipulación del producto (p. ej.: selección positiva de células CD34+). El pico de CPSP luego de la movilización con G-CSF se obtiene a partir del 4º día. Posteriormente, el recuento de células CD34+ comienza a caer aunque se continúe el tratamiento con G-CSF.⁹⁹ Teniendo en cuenta las consideraciones previas, una estrategia prudente para la movilización de CPSP en donadores normales podría ser: G-CSF 10 µg/Kg/día SC en dos aplicaciones diarias durante cuatro días, comenzando la recolección al 5º día 4 horas después de la 9ª inyección SC.

ALTERNATIVAS PARA LA REMOVILIZACION POR POBRE PRODUCTO CELULAR INICIAL

Como se ha señalado más arriba (ver FACTORES PREDICTIVOS...), un movilizador pobre se define como aquel que luego de repetidas leucoféresis no alcanza el umbral buscado de 5×10^6 células CD34+/Kg. Por otra parte se considera que una movilización ha fracasado cuando después de 3 leucoféresis no se llegó a 1×10^6 células CD34+/Kg.¹¹⁸ Esta situación se presenta en 10-13% de los casos.^{47, 48, 94, 118} La causa más común en estos pacientes es daño del estroma medular debido a exposición previa a quimioterapia como lo han sugerido modelos murinos.¹²⁰ Aquellos pacientes infundidos con $< 1 \times 10^6$ células CD34+/Kg tienen trombocitopenias prolongadas con un 25% de incidencia de morbimortalidad.¹¹⁸

En general se acepta que se obtiene mayor cantidad de progenitores hematopoyéticos luego de la movilización con quimioterapia y factores de crecimiento que con factores de crecimiento solamente^{48, 87}. En aquellos pacientes en los que se ha fracasado en una primera movilización corresponde un segundo intento, ya que aproximadamente la mitad de ellos alcanzarán el número

de células CD34+ necesario con quimioterapia y G-CSF o con G-CSF únicamente.¹¹⁹

Varias comunicaciones han mostrado que dosis crecientes de G-CSF aumentan progresivamente su poder movilizador de CPSP. Se han evaluado distintas dosis, comprobándose que 30-40 µg/Kg/día es claramente superior a 10 µg/Kg/día (dosis mínima recomendada para removilización) en cuanto al rendimiento de células CD34+ por aféresis,¹²¹ así como dosis de 16-32 µg/Kg/día, han permitido rescatar pacientes que fracasaron en un primer intento con dosis menores.¹¹⁹

También se ha postulado que algunos factores predictivos permiten anticipar cuales pacientes tendrán éxito en una segunda movilización y alcanzarán un número superior a 2.5×10^6 células CD34+/Kg sumando ambos intentos. En este sentido sexo femenino, diagnóstico de cáncer de mama y recolección de 1.5×10^6 células CD34+/Kg en la primera movilización pueden considerarse factores predictivos de buen pronóstico.¹¹⁹

En conclusión, todos los pacientes que hayan fracasado en una primera movilización pueden ser removilizados. Aproximadamente 50% de ellos alcanzarán el umbral de progenitores hematopoyéticos, sobre todo si se recolectó una cantidad mayor o igual a 1.5×10^6 células CD34+/Kg en el primer intento. El agente movilizador de elección es G-CSF a una dosis mínima de 10 µg/Kg/día durante 5 días. En pacientes en los que se sospecha un riesgo alto de fracaso de una segunda movilización, tal vez sea aconsejable utilizar dosis de 16 a 32 µg/Kg/día durante 5 días.

La necesidad de obtener un número adecuado de CPSP para autotransplante no sólo tiene una justificación médica, sino también connotaciones económicas. Se ha estimado que el costo adicional de recursos utilizados para dar soporte a un autotransplante para carcinoma de mama movilizado con quimioterapia + citoquinas con una celularidad entre 1 y 5×10^6 CD34+/Kg, comparado con aquellos que reciben $> 5 \times 10^6$ CD34+/Kg es de 4500 \$ de acuerdo a Glaspy¹²² y 8000 \$ según Weaver y col.¹²³ Es muy probable que estos costos sean aún mayores considerando el seguimiento a largo plazo de los pacientes.

Varias combinaciones de citoquinas de efecto en fases tempranas y tardías para obtener una mejor recolección de CPSP están en ensayo clínico. La combinación de filgrastim (G-CSF) y stem cell factor (SCF, ligando del c-kit) disminuye el número de leucoféresis necesarias para obtener $> 5 \times 10^6$ CD34+/Kg y aumenta la proporción de pacientes en los cuales se obtiene esta celularidad. Estos valores se consiguen luego del uso de estas citoquinas solamente o de la combinación de quimioterapia y citoquinas en pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo,¹²⁴ linfomas previamente tratados^{125, 126} y carcinoma de ovario sin tratamiento previo.¹²⁷ Esta combinación de citoquinas fue segura y aunque se

conoce que el SCF estimula mastocitos, no se observaron eventos adversos o significativos o complicaciones potencialmente letales bajo profilaxis con antihistamínicos. La mayoría de los pacientes (85%) tuvo reacciones locales en el sitio de la inyección consistente en eritema.

Estudios de fase II con el análogo de IL3 daniplestim han demostrado un aumento en la celularidad recolectada cuando se utilizó en combinación con filgrastim (G-CSF).¹²⁸ Ensayos preclínicos y de fase I sugieren que la trombopoyetina¹²⁹ y el ligando flt-3¹³² también aumentan el número de células precursoras movilizadas por factores de crecimiento mieloides. Además esta última citoquina sola o asociada a G-CSF ha demostrado efecto radioprotector en conejos, una observación que espera confirmación en pacientes condicionados con irradiación corporal total.¹³¹

La recolección de CPSP ha sufrido la rápida transición de una práctica experimental a su utilización rutinaria en un creciente listado de situaciones clínicas. Además la progresiva sofisticación de la manipulación celular ha resultado en intentos de regulación de estos procedimientos.^{132, 133} Esta nueva disciplina, que podría ser tentativamente denominada Hemoterapia Celular, requiere el concierto de profesionales que aporten el conocimiento biológico, clínico y técnico necesario para la implementación de los pasos sucesivos hasta obtener el producto celular adecuado para uno o más procedimientos de altas dosis de quimio +/- radioterapia: 1) decisión clínica de aceptación o exclusión de pacientes para esta práctica, 2) elección del método de movilización más efectivo y seguro, su administración y monitoreo, 3) procedimiento de recolección con separador celular con consideración del timing de inicio, volumen de sangre a procesar y número de sesiones de aféresis además del target celular a procurar, 4) evaluación funcional del producto por métodos de citometría de flujo y de cultivo celular corto y prolongado, 5) determinación de enfermedad mínima residual por técnicas inmunofenotípicas, citogenéticas y / o moleculares, 6) selección positiva de CPSP CD34+ y su eventual expansión en bioreactores en cultivo bajo estimulación con diversas combinaciones de citoquinas, 7) la criopreservación del producto y su mantenimiento prolongado, 8) la reinfusión luego del descongelamiento del material a transplantar.

Es evidente que la creciente complejidad de estas prácticas exigirá una especialización no encuadrada actualmente dentro de la Hematología y Hemoterapia tradicionales.

BIBLIOGRAFIA

1. Gratwhol A, Passweg J, Baldomero H y Hermans J. for the European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation (EBMT). Blood and bone marrow transplantation activity in Europe in 1996. **Bone Marrow Transplantation** 1998; 22:227
2. Frei E, Canellos G. Dose. A critical factor in cancer chemotherapy. **Am J Med** 1980; 69: 585
3. Hryniuk WM. Average relative dose intensity and the impact on design of clinical trials. **Semin Oncol** 1997; 1:66
4. To LB, Haylock DN, Simmons PJ y Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. **Blood** 1997; 89: 2233-2258
5. Metcalf D. Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells. the case for extrinsic regulation. **Blood** 1998; 92: 345
6. Lansdorp P. Self renewal of stem cells. **Biology of Blood and Marrow Transplantation** 1997; 3: 171-178
7. Bradford GB, Williams B, Rossi R y Bertoncello I. Quiescence, cycling and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. **Experimental Hematology** 1997; 25: 445
8. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. **Development** 1990; 10: 1001
9. Pawliuk R, Eaves C, Humphries R. Evidence of both ontogeny and transplant dose regulated expansion of hematopoietic stem cells in vivo. **Blood** 1996; 88:2852
10. Fairbairn L, Cowling G, Dexter T. Suppression of apoptosis allows differentiation and development of a multipotent hematopoietic cell line in the absence of growth factors. **Cell** 1993; 74: 823
11. McArthur GA, Longmore GL, Klingler K y Johnson GR. Lineage-restricted recruitment of immature hematopoietic cells in response to erythropoietin after normal hematopoietic cell transfection with erythropoietin receptor. **Exp Hematol** 1995; 23: 645
12. McArthur GA, Rohrschneider LR, Johnson GR. Induced expression of c-fms in normal hematopoietic cells shows evidence for both conservation and lineage restriction of signal transduction in response to macrophage colony-stimulating factor. **Blood** 1994; 83: 972
13. Shivdasani RA, Orkin SH. The transcriptional control of hematopoiesis. **Blood** 1996; 87: 4025
14. Ogawa M, Porter PN, Nakahata T. Renewal and commitment of differentiation of hematopoietic stem cells (an interpretive review). **Blood** 1983; 61: 823
15. Metcalf D, Burgess AW. Clonal analysis of progenitor cell commitment to granulocyte or macrophage production. **J Cell Physiol** 1982; 111:275
16. Metcalf D, Nicola NA. The hemopoietic colony-stimulating factors: from biology to clinical applications. **Cambridge, UK, Cambridge University**, 1995.
17. Smith A, Metcalf D, Nicola NA. Cytoplasmic domains of the common beta-chain of the GM-CSF/

- IL-3/IL-5 receptors that are required for inducing differentiation or clonal suppression in myeloid leukaemic cell lines. **EMBO J** 1997; 16: 451
18. Lansdorp PM. Telomere length and proliferation potential of hematopoietic stem cells. **J Cell Sci** 1995; 108: 1
 19. Chiu C-P, Dragowska W, Kim NW y col. Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. **Stem Cells** 1996; 14: 239
 20. Harley CB. Telomeres and aging. In: Telomeres. Cold Spring Harbor, NY. **Cold Spring Harbor Laboratory Press** 1995; 247
 21. Long MW. Blood cell cytoadhesion molecules. **Exp Hematol** 1992; 20: 288
 22. Simmons PJ, Zannettino A, Gronthos S y Leavesley D. Potential adhesion mechanisms for localisation of haematopoietic progenitors to bone marrow stroma. **Leuk Lymphoma** 1994; 12: 353
 23. Vermeulen M, Le Pasteur F, Gagnerault MC, y col. Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells. **Blood** 1998; 92: 894
 24. Williams DA, Rios M, Stephens C y Patel VP. Fibronectin and VLA-4 in hematopoietic stem cell-microenvironment. **Nature** 1991; 352
 25. Jacobson K, Kravitz J, Kincade PW y Osmond DG. Adhesion receptors on bone marrow stromal cells. In vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma irradiated mice. **Blood** 1996; 87: 73
 26. Derskson MW, Gerritsen WR, Rodenhuis S y col. Expression of adhesion molecules on CD34+ cells: CD34+ L-selectin+ cells predict a rapid platelet recovery after peripheral blood stem cell transplantation. **Blood** 1995; 85: 3313
 27. Levesque J-P, Leavesley DI, Niuitta S y col. Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen VLA - 4 and VLA-5 integrins. **J Exp Med** 1995; 1805
 28. Maximow A. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschieden Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. **Folia Haemat** 1909; (Lpz) 8: 125
 29. Goodman J, Hodgson G. Evidence of stem cells in the peripheral blood of mice. **Blood** 1962; 19: 702
 30. Gale R, Butturini A, Henon P. Is there a reason to use blood transplants? **Int. Journal Cell Cloning** 1992; 10: 74
 31. Richman C, Weiner R, Yankee R. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. **Blood** 1988; 47: 1031
 32. Duhrsen U, Villeval JL, Boyd J, y col. Effects of rG-CSF on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. **Blood** 1988; 72: 2074
 33. Socinski MA, Cannistra SA, Elías A, y col. Granulocyte-macrophage colony simulating factor expands the circulating hematopoietic progenitor cell compartment in humans. **Lancet** 1988; 1: 1194
 34. Teshima T, Harada M, Takamatsu Y y col. Cytotoxic drug/G-CSF mobilization of peripheral blood stem cells and their use for autografting. **Bone Marrow Transplantation** 1992; 10: 215
 35. Korbling M, Flidner T. The evolution of clinical peripheral blood stem cell transplantation. Historical perspective. **Bone Marrow Transplantation** 1996; 17: 675
 36. Beyer J, Schwella N, Zingsem J y col. Hematopoietic rescue after high-dose chemotherapy using autologous peripheral-blood progenitor cells or bone marrow: a randomized comparison. **J Clin Oncol** 1995; 13: 1328
 37. Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID. Human hematopoietic precursors in long term culture: Single CD34+ cells that lack detectable T cell and myeloid cell antigens produce multiple colony-forming cells when cultured with marrow stromal cells. **J Exp Med** 1990; 172: 355
 38. Civin C. Purified progenitor stem cells: background, feasibility and prospects for clinical transplantation. **Int. J. Cell Cloning** 1992; 10: 16
 39. Siena S, Bregni M, Ravagnani F y col. Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human GM-CSF. **Blood** 1989; 74: 1905
 40. Bender JG, Williams SF, Myers S y col. Characterization of chemotherapy mobilized peripheral blood progenitor cells for use in autologous stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation** 1992; 10: 281
 41. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M y col. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. **J. Hematotherapy** 1996; 5: 213
 42. Pecora AL, Petri RA, Gleim GWA, y col. CD34+ CD 33- cells influence days to engraftment and transfusion requirements in autologous blood stem-cell recipients. **J Clin Oncol** 1998; 16: 2093
 43. Millar BC, Millar JL, Shepherd V y col. The importance of CD34+/CD33- cells in platelet engraftment after intensive therapy for cancer patients given peripheral blood stem cell rescue. **Bone Marrow Transplantation** 1998; 22: 469
 44. Sutherland III, Lansdorp PM, Henkelman DH y col. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cell cultures at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. **Proc Natl Acad Sci USA** 1990; 87: 3584
 45. Pettengell R y Testa NG. Biology of the blood progenitor cells used in transplantation. **Int J Hematol** 1995; 61: 1-15
 46. Koziner B. Transplante de células precursoras de san-

- gre periférica: fundamento, metodología y aplicaciones clínicas. **Bio-Reguladores** 1994; 3: 174-187
47. Weaver C, Hazelton B, Birch R y col. An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative therapy. **Blood** 1995; 86: 3961
 48. Bensinger WI, Longin K, Appelbaum F y col. Peripheral blood stem cells (PBSCs) collected after recombinant granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF). An analysis of factors correlating with the tempo of engraftment after transplantation. **Br J Haematol** 1994; 87: 825
 49. Femand JP, Levy Y, Gerota J y col. Treatment of aggressive multiple myeloma by high-dose chemotherapy and total body irradiation followed by blood stem cell autologous graft. **Blood** 1988; 1: 20
 50. Gribben JG, Neuberger D, Barber M y col. Detection of residual lymphoma cells by polymerase chain reaction in peripheral blood is significantly less predictive for relapse than detection in bone marrow. **Blood** 1994; 83: 3800
 51. Gribben JG, Freedman AS, Neuberger D y col. Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. **N Engl J Med** 1991; 325: 1525
 52. Lambrechts AC, Hupkes PE, Dorssers LCJ y col. Translocation (14; 18) – positive cells are present in the circulation of the majority of patients with localized (Stage I and II) follicular non-Hodgkin's lymphoma. **Blood** 1993; 82: 2510
 53. Negrin RS, Pesando J, Long GD y col. Comparison of tumor cell contamination of «purged» bone marrow to peripheral blood mononuclear cells assessed by PCR in non-Hodgkin's lymphoma. **Blood** 1992; 80: 235a
 54. Moss TJ, Sanders DG. Detection of neuroblastoma cells in blood. **J Clin Oncol** 1990; 8: 736
 55. Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM y col. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. **Blood** 1993; 82: 2605
 56. Ross AA, Cooper BW, Lazarus H y col. Incidence of tumor cell contamination in peripheral blood stem cell (PBSC) collections from breast cancer patients. **Proc Am Soc Clin Oncol** 1993; 12: 68
 57. Brugger W, Bross KJ, Glatt M y col. Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. **Blood** 1994; 83: 636
 58. Brenner MK, Rill DR, Moen RC y col. Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone marrow transplantation. **Lancet** 1993; 341: 85
 59. Fukada M, Matsuyama T. Autotransplantation of peripheral blood stem cells mobilized by chemotherapy and rhG-CSF in childhood neuroblastoma and NHL. **Br J Haematol** 1992; 80: 327
 60. Kotasec D, Shepherd KM, Sage RE y col. Factors affecting blood stem cell collection following high dose cyclophosphamide mobilization in lymphoma, myeloma and solid tumors. **Bone Marrow Transplantation** 1992; 9: 11
 61. Spitzer G, Adkins D, Mathews M y col. Randomized comparison of G-CSF + GM-CSF vs G-CSF alone for mobilization of peripheral blood stem cells: effects on hematopoietic recovery after high dose chemotherapy. **Bone Marrow Transplantation** 1997; 20: 921
 62. Mahendra P, Johnson D, Scott MA y col. Peripheral blood progenitor cell transplantation: a single centre experience comparing two mobilization regimens in 67 patients. **Bone Marrow Transplantation** 1996; 17: 503
 63. Dicke KA, Hood D, Hanks S. Peripheral blood stem cell collection after mobilization with intensive chemotherapy and growth factors. **J Hematotherapy** 1994; 3: 141
 64. Mc Quaker I, Haynes A, Stainer C y col. Stem cell mobilization in resistant or relapsed lymphoma, superior yield of progenitor cells following a salvage regimen comprising Ifosfamide and epirubicin compared to intermediate dose cyclophosphamide. **Br J Haematol** 1997; 98: 228
 65. Steward DA, Guo D, Brown C y col. Superior autologous blood stem cell mobilization with dose-intensive cyclophosphamide, etoposide, cisplatin (DICEP) + G-CSF than with less intense chemotherapy + G-CSF. **Blood** 1997; 90: 99a
 66. Schidt I, Knudsen LM, Jensen L y col. Flow cytometry comparison of CD34+ subsets in bone marrow and peripheral blood after priming with glycosylated or nonglycosylated rhG-CSF. **Bone Marrow Transplantation** 1998; 21: 1167
 67. Bolwell BJ, Fishleder A, Andresen SW y col. G-CSF primed PBPC in autologous bone marrow transplantation: parameters affecting bone marrow engraftment. **Bone Marrow Transplantation** 1993; 12: 609
 68. Kahn DG, Prilutskaya M, Cooper B y col. The relationship between the incidence of tumor contamination and number of pheresis for stage IV breast cancer. **Blood** 1997; 90: 565
 69. Shea TC, Mason JR, Storniolo AM y col. Sequential cycles of high-dose carboplatin administered with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and repeated infusions of autologous peripheral- blood progenitor cells: A novel and effective method for delivering multiple courses of dose-intensive therapy. **J Clin Oncol** 1992; 10: 464
 70. Brugger W, Mocklin W, Heimfeld S y col. Ex vivo

- expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 beta, IL-6, IL-3, interferon gamma and erythropoietin. **Blood** 1993; 81: 2579
71. Haylock DN, To LB, Dose TL y col. Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34+ hematopoietic progenitor cells. **Blood** 1992; 80:1405
 72. McNiece I, Andrews R, Stewart M y col. Action of interleukin-3, G-CSF and GM-CSF on highly enriched human hematopoietic progenitor cells: synergistic interaction of GM-CSF plus G-CSF. **Blood** 1989; 74: 110
 73. Mc Niece IR, Langley RF, Zsebo RM. Recombinant human stem cell factor synergizes with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and EPO to stimulate human cells of the myeloid and erythroid lineages. **Exp Hematol** 1991; 19: 226
 74. Moore MAS. Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. **Blood** 1991; 78: 1
 75. Stiff P, Oldenberg D, Hsi E y col. Transplantation of ex vivo expanded cells grown in Aastrom stromal-based perfusion bioreactors from small marrow aliquots (40 ml) produces durable hematopoietic reconstitution after ablative chemotherapy. **Blood** 1997; 90: 395
 76. Koumakis G, Vassilomanolakis M, Hatzichristou H y col. Predictive factors affecting mobilization and peripheral blood stem cell collection using single apheresis for rescuing patients after high-dose chemotherapy in various malignancies. **Bone Marrow Transplantation** 1996; 18: 1065
 77. Liberati AM, De Angelis V, Stivaktaki A y col. Analysis of factors that influence stem cell yield in patients with hematologic neoplasias. **Blood** 1997; 90: 330
 78. Ketterer N, Salles G, Tremisi P y col. Analysis of factors influencing 300 peripheral blood progenitor cell collections in 273 patients treated for lymphoproliferative diseases. **Blood** 1997; 90: 213
 79. Abboud CN, Lieveld JL, Belanger TJ y col. Progenitor kinetics after cytoxan plus G-CSF, GM-CSF, G+GM-CSF or pixy 321 mobilization. **Blood** 1997; 90: 98a
 80. Raman Desikan K, Barlogie B, Jagannath S y col. Comparable engraftment kinetics following peripheral blood stem cell infusion mobilized with G-CSF, with or without cyclophosphamide in multiple myeloma. **J Clin Oncol** 1998; 16: 1547
 81. de Greef GE, de Winter F, Luyten A y col. High dose cyclophosphamide is not superior to other chemotherapy schedules with respect to their mobilising capacity. **Blood** 1997; 90: 324b
 82. Gianni A, Bonadonna G y col. High-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation compared with MACOP-B aggressive B-cell lymphoma. **N Engl J Med** 1997; 336: 1290
 83. Perry AR, Watts MJ, Peniket AJ y col. Progenitor cell yields are frequently poor in patients with histologically indolent lymphomas especially when mobilized within 6 months of previous chemotherapy. **Bone Marrow Transplantation** 1998; 21:1201
 84. Tarella C, Boccadoro M, Omede P y col. Role of chemotherapy and GM-CSF on hematopoietic progenitor cells mobilization in multiple myeloma. **Bone Marrow Transplantation** 1993; 11: 271
 85. Goldschmit H, Hegenbart U, Haas R y Hunstein W. Mobilization of peripheral blood progenitor cells with high dose cyclophosphamide (4 or 7 g/m²) and granulocyte colony-stimulating factor in patients with multiple myeloma. **Bone Marrow Transplantation** 1996; 17: 691
 86. Barlogie B, Jagannath S, Vesole DH col. Superiority of tandem autologous transplantation over standard therapy for previously untreated multiple myeloma. **Blood** 1997; 89: 789
 87. Demirer T, Buckner CD, Gooley T y col. Factors influencing collection of peripheral blood stem cells in patients with multiple myeloma. **Bone Marrow Transplantation** 1996; 17: 937
 88. Tricot G, Jagannath S, Vesole D y col. Peripheral blood stem cell transplants for multiple myeloma: identification of favorable variables for rapid engraftment in patients. **Blood** 1995; 85: 588
 89. Worel N, Schlogl E, Rabitsch W y col. Predictive factors in peripheral blood stem cell harvests in multiple myeloma. **Blood** 1997; 90: 339b
 90. Guba SC, Vesole DH, Jagannath S y col. Peripheral stem cell mobilization and engraftment in patients over age 60. **Bone Marrow Transplantation** 1997; 20: 1
 91. Schots R, Van Riet I, Damiens S y col. The absolute number of circulating CD34+ cells predicts the number of hematopoietic stem cells that can be collected by apheresis. **Bone Marrow Transplantation** 1996; 17: 509
 92. Engelhardt, Winkler J, Waller C y col. Blood progenitor cell (BPC) mobilization studied in multiple myeloma, solid tumors and non Hodgkin lymphoma patients after combination chemotherapy and G-CSF. **Bone Marrow Transplantation** 1997; 19: 529
 93. Desikan K, Tricot S, Barlogie B y col. Stem cell collection in myeloma patients: Repeated attempts may be needed to obtain an adequate harvest in patients failing to collect well initially. **Blood** 1997; 90: 324
 94. Dansey R, Klein J, Karanes C y col. Successful peripheral blood mobilization of CD34+ progenitor cells by cyclophosphamide, paclitaxel and G-CSF after failure with G-CSF alone. **Blood** 1997; 90: 98a
 95. de Magalhaes-Silverman M, Donnenberg A, Hammert L y col. Factors influencing mobilization

- and engraftment in patients with metastatic breast cancer undergoing PBSC transplantation. **Blood** 1997; 90:214a
96. Pecora AL, Lazarus HM, Cooper B y col. Breast contamination in peripheral blood stem cells collections, association with bone marrow disease and type of mobilization. **Blood** 1997; 99a
 97. Meehan KR, Ebadi-Tehrani M, Areman EH y col. Priming with high dose paclitaxel and rh G-CSF for breast cancer patients. **Blood** 1997; 90: 331b
 98. Bensinger W, Clift R, Appelbaum F y col. Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by rhG-CSF. **Stem Cells** 1996; 14: 90
 99. Roberts A, Grigg A.. Optimal regimens for the mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells from normal donors. **Leuk Lymphoma** 1997; 27: 77
 100. Korblyng M, Przepiorcka D, Huh YO y col. Allogeneic blood stem cell transplantation for refractory leukemia and lymphoma: potential advantage of blood over marrow allografts. **Blood** 1995; 85: 1659
 101. Waller CF, Berts H, Wenger MK, y col. Mobilization of peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: efficacy and toxicity of high-dose rhG-CSF regimen. **Bone Marrow Transplantation** 1996; 18: 279
 102. Schmitz N, Bacigalupo A, Hasenclever D y col. Allogeneic bone marrow transplantation vs filgrastim-mobilized peripheral blood progenitor cell transplantation in patients with early leukaemia: first results of a randomised multicentre trial of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. **Bone Marrow Transplantation** 1998; 21: 995
 103. Bensinger WI, Price TH, Dale DC y col. The effects of daily recombinant human administration on normal granulocyte donors undergoing leukapheresis. **Blood** 1993; 81: 1883
 104. Kawano Y, Takahue Y, Watanabe T y col. Peripheral blood stem cell mobilization with granulocyte colony-stimulating factor and a harvesting procedure in pediatric donors. **Bone Marrow Transplantation** 1998; 21: Suppl 3, S32
 105. Anderlini P, Przepiorcka D, Korblyng M y Champlin R. Blood stem cell procurement: donor safety issues. **Bone Marrow Transplantation** 1998: Suppl 3. S35
 106. Cleaver SA y Goldman JM. Use of G-CSF to mobilise PBSC in normal healthy donors – an international survey. **Bone Marrow Transplantation** 1998: Suppl 3. S29
 107. Tanaka J, Imamura M, Zhu X y col. Potential benefit of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor-mobilised peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation. **Blood** 1994; 8: 3595
 108. Suzue, Kawano Y, Takaue Y y col. Cell processing protocol for allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by human granulocyte colony-stimulating factor. **Exp. Hematol.** 1994; 22: 888
 109. Schmitz N, Dreger P, Suttrop M y col. Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (granulocyte colony- stimulating factor). **Blood** 1995; 85: 1666
 110. Grigg AP, Roberts A, Raunow W y col. Optimising dose and scheduling filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor) for mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells in normal volunteers. **Blood** 1995; 86: 4437
 111. Lane TA, Law P, Maruyama M y col. Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. **Blood** 1995; 85: 275
 112. Korblyng M, Przepiorcka D, Huh YO y col. Allogeneic blood stem cell transplantation for refractory leukemia and lymphoma: potential advantage of blood over marrow allografts. **Blood** 1995; 85: 1659
 113. Bensinger WI, Weaver CH, Appelbaum FR y col. Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. **Blood** 1995; 85, 1655
 114. Arbona C, Prosper F, Benet I y col. Comparison between once a day vs twice a day G-CSF for mobilization of peripheral blood progenitor cells (PBPC) in normal donors for allogeneic PBPC transplantation. **Bone Marrow Transplantation** 1998; 22: 39
 115. Watts MJ, Addison I, Ings SJ y col. Optimal timing for collection of PBPC after glycosylated G-CSF administration. **Bone Marrow Transplantation** 1998; 21: 365
 116. Bishop MR, Tarantolo SR, Bierman PJ y col. Predictive factors for the identification of allogeneic blood stem cell donors as «poor mobilizers» prior to stem cell collection. **Blood** 1997; 90: 592a
 117. Roberts A, De Luca E, Grigg A. Broad inter-individual variations in circulating progenitor cell numbers induced by G-CSF therapy. **Stem Cells** 1995; 13: 512
 118. Stiff P, Malhotra D, Bayer R y col. High dose G-CSF improves stem cell mobilization and collection compared to standard doses in patients with ovarian cancer which leads to a decrease in delayed platelet engraftment following stem cell transplants. **Blood** 1997; 90: 591a
 119. Weaver CH, Tauer K, Zhen B y col. Second attempts at mobilization of peripheral blood stem cells in patients with initial low CD34+ cell yields. **J Hematother** 1998; 7: 241
 120. Neben S, Marous K, Minch P. Mobilization of hematopoietic stem and progenitor cell populations

- from marrow to the blood of mice following cyclophosphamide and/or granulocyte colony-stimulating factor. **Blood** 1993; 81: 1960
121. Weaver CH, Birch R, Greco y col. Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells: A randomized dose escalation trial of filgrastin. **Brit J Haemat** 1997; 100: 338
 122. Glaspy J, Lu J, Wheeler C y col. Economic rationale for infusing optimal numbers of CD34+ cells in peripheral blood progenitor cell transplant. **Blood** 1997; 90: 370a
 123. Weaver CH, Birch R, Schulman, KA. Effect of cell dose on resource utilization in patients undergoing transplant with peripheral blood progenitor cells. **Blood** 1997; 90: 370a
 124. Shpall EJ, Wheeler SA, Turner S y col. A randomized phase 3 study of PBPC mobilization by stem cell factor (SCF, Stemgen) and filgrastim in patients with high risk breast cancer. **Blood** 1997; 90: 2627
 125. Moskowitz CH, Stiff P, Gordon MS y col. Recombinant methionyl human stem cell factor and filgrastim for peripheral blood progenitor cell mobilization and transplantation in non-Hodgkin's lymphoma patients - Results of a phase I/II trial. **Blood** 1997; 89: 3136
 126. Stiff P, Gingrich R, Luger S y col. Improved PBPC collection using Stemgen (stem cell factor, SCF) and filgrastim(G-CSF) compared to G-CSF alone in heavily pretreated lymphoma and Hodgkin's disease patients. **Blood** 1997; 89: 2628 a
 127. Weaver A, Ryder D, Crowther D y col. Increased numbers of long- term culture-initiating cells in the apheresis product of patients randomized to receive increasing doses of stem cell factor administered in combination with chemotherapy and a standard dose of granulocyte colony-stimulating factor. **Blood** 1996; 88: 3323
 128. Dipersio JF, Schuter MW, Winter JN y Abboud CN. Phase II study of peripheral blood progenitor cell mobilization using daniplestim plus G-CSF in patients with breast cancer or lymphoma. En «Nobel hematopoietic growth factors in peripheral blood stem cell transplantation» Simposio que tuvo lugar en Keystone, Colorado el 12 de enero, 1998.
 129. Basser RL, Rasko JEJ, Clarke K, Cebon J y col. Randomized, blinded, placebo controlled phase I trial of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor with filgrastim after dose-intensive chemotherapy in patients with advanced cancer. **Blood** 1997; 89: 3138
 130. Lebsack ME, Mc Kenna HJ, Hoeck JA y col. Safety of FLT3 ligand in healthy volunteers. **Blood** 1997; 90: 170a
 131. Gratwohl A, John L, Baldomero H y col. FLT-3 ligand provides hematopoietic protection from total body irradiation in rabbits. **Blood** 1998; 92: 765
 132. Turner ML, McClelland DBL, Franklin IM. Haemopoietic progenitor cell harvesting processing and storage: global regulation to ensure the quality of products for patients. **Brit J Haematol** 1997; 99: 715
 133. Shpall EJ, Champlin RE, Eaves AC y col. Foundation for the accreditation of hematopoietic cell therapy (FAHCT) response to FDA (Docket N° 97 N-0068). **J Hematotherapy** 1997; 6: 287