

Autotrasplante de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica conservados a 4°C en mieloma múltiple. Comparación con métodos convencionales

Autologous peripheral blood progenitor stem cell transplantation stored at 4°C. Comparison with conventional methods

Shanley C¹, Bullorsky E¹, Stemmelin G¹, Berro M², Kusminsky G², Trucco J², Milone J³, López M³, Martínez Rolón J⁴, Bentolila G⁴, Real J⁵, Milovic V⁵, Requejo A⁵, Dallasta G⁶, Gatto S⁶, Jaimovich G^{6,7}, Feldman L⁷, Endara A⁷, Irazu L⁸.

¹Hospital Británico de Buenos Aires, ²Hospital Universitario Austral, ³Hospital Italiano de la Plata, ⁴FUNDALEU, ⁵Hospital Alemán, ⁶Sanatorio Anchorena, ⁷Fundación Favaloro, ⁸INEI-ANLIS. ^{1,2,3,4,5,6,7,8}GATMO

claudiashanley@gmail.com

Mención al mejor trabajo el marco del "1^{er} Congreso de Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas / 2^{do} Congreso del LABMT"

Fecha recepción: 17/10/2017
Fecha aprobación: 21/11/2017



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA
Volumen 21 n° 3: 263-273
Septiembre - Diciembre 2017

Palabras claves: trasplante de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica, conservación de células madre a 4°C, criopreservación, mieloma múltiple.

Keywords: peripheral blood stem cell transplantation, stem cell storage at 4°C, cryopreservation, multiple myeloma.

Introducción

El tratamiento de inducción seguido de consolidación con altas dosis de quimioterapia y posterior rescate con progenitores hematopoyéticos de sangre periférica autólogos (PHSP) es el tratamiento de elección en mieloma múltiple (MM) para pacientes aptos⁽¹⁻⁶⁾. Dado que el régimen condicionante que habitualmente se utiliza es melfalán (MEL) monodroga, que tiene una depuración rápida, hemos

implementado una técnica simple y alternativa a la criopreservación celular con temperaturas ultra bajas (-80°C ó -196°C) conservando las células madre a 4°C hasta su reinfusión sin el agregado de mezcla crioprotectante⁽⁷⁻⁹⁾. En este contexto desarrollamos un estudio retrospectivo y multicéntrico comparando los resultados obtenidos por la técnica a 4°C con los del método convencional (-80°C/-196°C).

Objetivo

Establecer si existen diferencias estadísticamente significativas entre la conservación de PHSP a 4°C y la criopreservación convencional, en pacientes portadores de MM, acondicionados con melfalán 200mg/m² (M200) y movilizados sólo con filgrastrin (G-CSF).

Materiales y métodos

Se incluyeron 405 pacientes, 141/405 (34,82%) con PHSP conservados a 4°C (grupo A) y 264/405 (65,18%) criopreservados a -80°C/-196°C (grupo B), tratados en 7 instituciones del Grupo Argentino de Trasplante de Médula Ósea (GATMO). Se consideraron criterios de inclusión: primer trasplante, movilización sólo con G-CSF (10 µg/kg/día)⁽¹⁰⁻¹¹⁾ y el acondicionamiento fue M200. Para los pacientes del grupo A, los PHSP recolectados por leucoféresis con separadores celulares de flujo continuo fueron mantenidos en reposo en heladera a 4°C hasta su reinfusión, sin el agregado de ningún aditivo, con la excepción del anticoagulante (citrato de Na) usado de rutina en estos procedimientos. El tiempo de permanencia a 4°C varió de 24 a 72 hs, dependiendo de la decisión de cada Unidad de Trasplante. Parece importante señalar que en más del 90% de los casos el producto fue reinfundido en su totalidad entre las 24 y 48 hs desde su recolección. No se utilizó premedicación antes de la infusión en la mayoría de los pacientes. En el procedimiento convencional, una vez recolectados los PHSP por leucoféresis, para su criopreservación se utilizó mezcla crioprotectante que incluyó en todos los casos dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 5-10%, variando según la modalidad del centro. HES (hidroxietilalmidón) en concentración final variable (aproximadamente 5%), albúmina, medio de cultivo y plasma autólogo fueron también incluidos de forma no uniforme entre las diferentes instituciones. Los productos fueron criopreservados en ultra-

freezers a -80°C o en nitrógeno líquido a -196°C, según técnicas previamente autorizadas por el ente regulador (INCUCAI). En estos casos, la mayoría de los pacientes recibieron algún tipo de premedicación pre trasplante.

Para comparar ambas poblaciones se utilizaron las siguientes variables: número de células CD34+ infundidas, *engraftment* polimorfonuclear (PMN) (>500/mm³, sostenido por 72 horas y sin factores estimulantes de colonias), *engraftment* plaquetario (>25000/mm³, sostenido por 72 horas, sin necesidad de transfusión), requerimiento transfusional de glóbulos rojos (GR), de concentrados de plaquetas, incidencia de infecciones, días de internación y mortalidad asociada al trasplante (MRT) al día +100.

Se utilizaron estadísticos descriptivos: promedio y rango (min-máx) o mediana y rango inter cuartil (RIC), según correspondiera en cada caso. Además, se emplearon medios gráficos (barras y *box-plot*) para la presentación de los resultados.

En los casos en que la distribución de los datos no cumplía con los requerimientos de los procedimientos paramétricos se utilizaron tests no paramétricos considerando en todos los casos un nivel de significación α de 5%.

Los datos se volcaron en una planilla de cálculo Excel, analizándose con el programa estadístico IBM SPSS *Statistics* 21.0 (*Statistical Package for Social Sciences* - 2012).

Resultados

La edad media de los pacientes fue de 57 años (26-73) grupo A y 55 años (26-72) grupo B (**Figura 1**). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de sexo entre grupos $p=0.20$ (**Figura 1**). El promedio de células CD34+ infundidas fue de 6,35x10⁶/kg (0,42 y 20,2) para el grupo A y de 5,03x10⁶/kg (1,13-23,4) para el grupo B (**Figura 2; Tabla 1**), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$).

Tabla 1. Estadísticos y valores de significación

	TRANSFUSIONES					
	CD34	ENG.>500 PMN	ENG.PLAQ >25.000	GR	Concentrado plaquetario	Días de internación
Mann-Whitney						
U	13576	10758,5	8150,5	9275,5	16971,5	2170,5
p	0,00	0,00	0,00	0,10	0,63	0,00

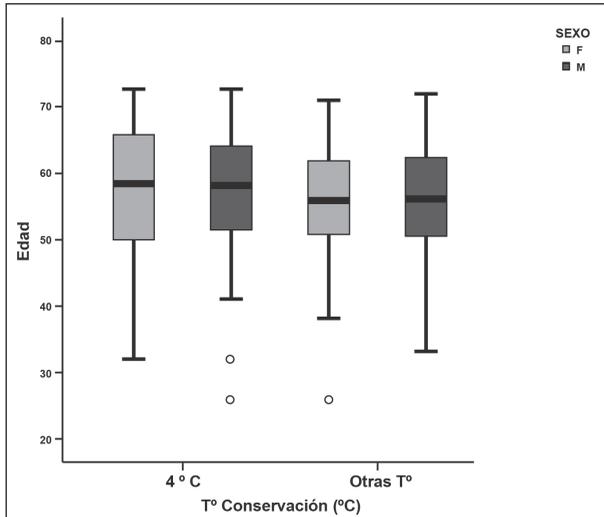


Figura 1. Distribución según edad y sexo para cada grupo

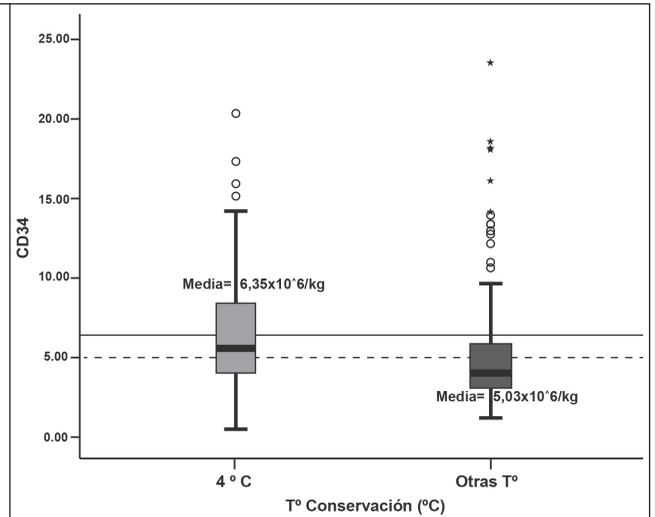


Figura 2. Células CD34 infundidas

La mediana de días para el *engraftment* PMN fue de 11 días (8-48) para el grupo A y 12,5 días (7-43) para el grupo B ($p < 0,05$) (Tabla 1). Si bien los valores de mediana son semejantes, las distribuciones de ambos grupos muestran diferencias, como se observa en la Figura 3a donde la línea horizontal llena muestra que en el grupo A el percentil 75 corresponde a los 12 días post trasplante, mientras que a otras temperaturas la línea horizontal punteada muestra

que el percentil 25 se ubica a los 11 días post trasplante ($p < 0,05$) (Tabla 1). El *engraftment* plaquetario fue 13.2 días (8-53) grupo A y 15,5 días (0-150) grupo B. Si bien el 50% de los pacientes de ambos grupos alcanzaron aproximadamente el nivel de plaquetas en la misma cantidad de días, los pacientes del grupo B presentaron mayor dispersión, lo que genera una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (Figura 3b; Tabla 1).

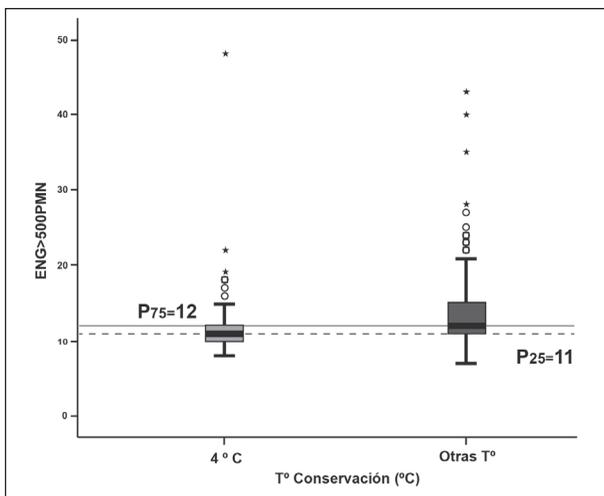


Figura 3a. Días de engraftment PMN

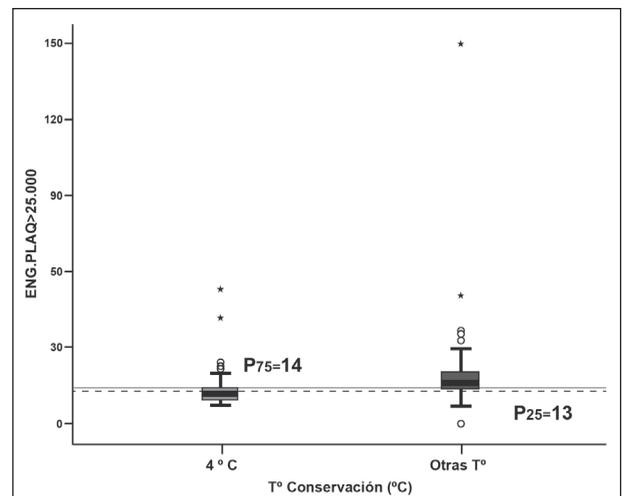


Fig. 3b. Días de engraftment plaquetario

El promedio de transfusiones de GR fue 0,78 U (0-5) para el grupo A y 1,06 U (0-16) para el grupo B. La diferencia no es significativa ($p = 0,10$) (Tabla 1). Cabe destacar que ningún paciente del grupo A requirió más de 5 transfusiones de GR (Figura 4a). El promedio de transfusiones de concentrados de plaquetas fue de 2,43 (0-24) para el grupo A y de

5,78 (0-110) para el grupo B, esta diferencia no resultó significativa ($p = 0,62$) (Figura 4b; Tabla 1). La mediana de días de internación de los pacientes que recibieron infusión conservada a 4°C fue 14 días (10-25), menor que la del grupo B que fue de 20 días (3-53) ($p < 0,05$). (Figura 5; Tabla 1).

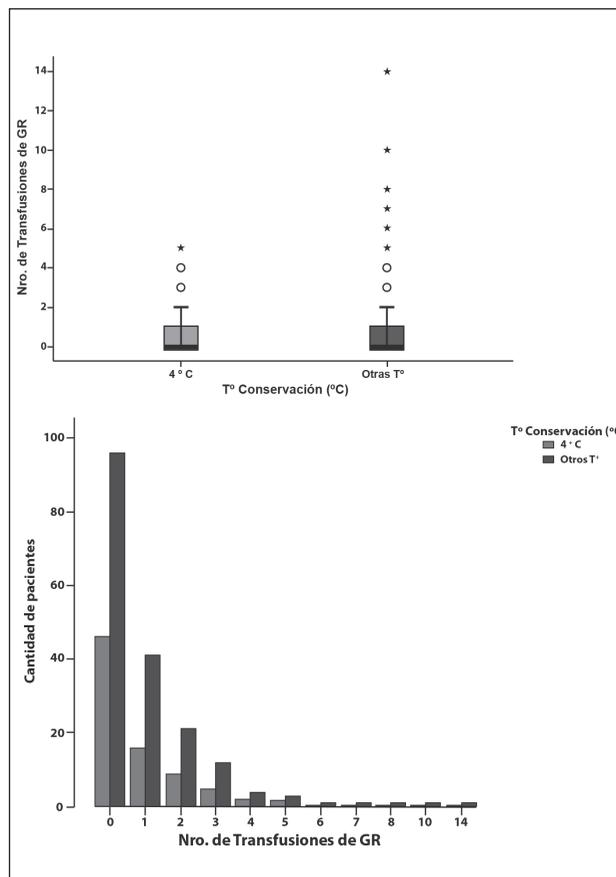


Figura 4a. Requerimiento transfusional de glóbulos rojos

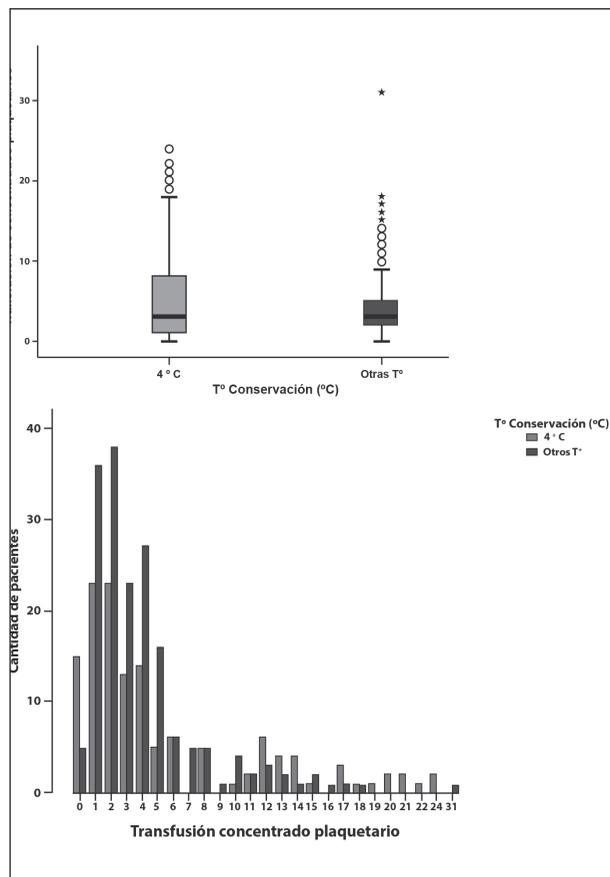


Figura 4b. Requerimiento transfusional de concentrado plaquetario

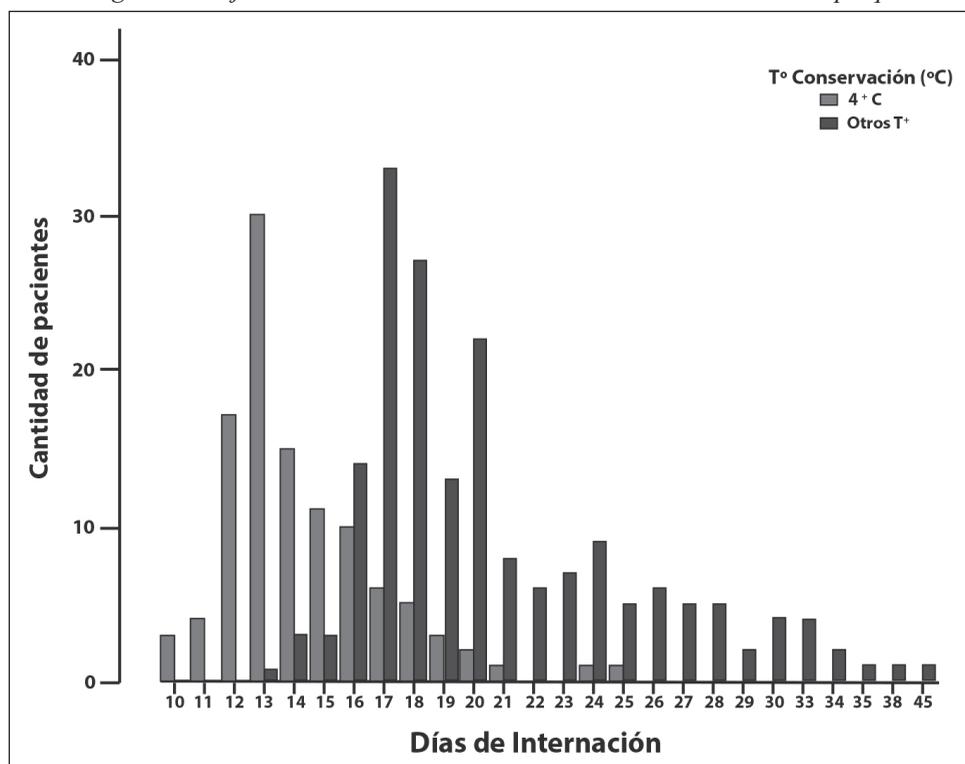


Figura 5. Días de internación

El subregistro de la incidencia de infecciones resultó ser una limitación para su análisis debido a que no nos permite alcanzar resultados concluyentes (Tabla 2). Sin embargo, analizando los datos disponibles, (n=113 para el grupo A y n=172 para el grupo B), sobre el total de infecciones registradas el

número de eventos reportados fue menor en el grupo A, 30.1% vs 69.9% (p<0,05) (Figura 6).

La MRT al día +100 fue menor para el grupo A (5/138 = 3.6%), respecto del grupo B (26/271 = 9.6%); (p<0,05) (Figura 7).

Tabla 2. Subregistro de infecciones

	Infección		Total n(%)
	Sí n(%)	No n(%)	
T° de Conservación			
4°C	47 (41,6)	66 (58,4)	113 (100)
Otras T°	105 (62,5)	63 (37,5)	168 (100)
Subtotal	152 (64,1)	129 (45,9)	281 (100)
Datos perdidos	28	96	124
Total	180	225	405

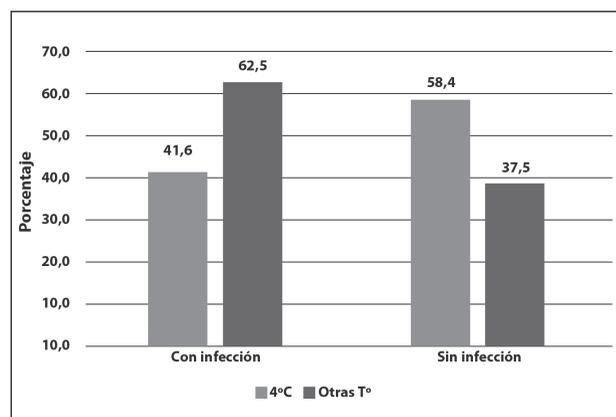


Figura 6. Incidencia de infecciones

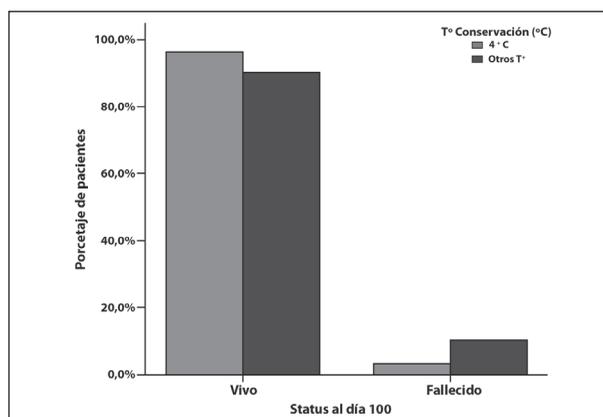


Figura 7. Status al día +100

Ningún paciente del grupo A tuvo reacciones adversas asociadas a la infusión. Cuatro pacientes presentaron reacciones adversas asociadas a la infusión de PHSP en grupo B (1/4 precordialgia, 1/4 taquicardia, 2/4 desaturación).

Como las diferentes medidas de soporte disponibles en cada momento habrían podido explicar parcial-

mente las diferencias a favor del grupo A, realizamos un subanálisis donde sólo se incluyeron 328 pacientes trasplantados entre 01/2011 y 12/2016 (n: 328). Los resultados encontrados confirman los del grupo total (Tabla 3), con la única excepción de la MRT +100 que no resultó diferente entre ambos grupos (Figuras 8-10).

Tabla 3. Estadísticos y valores de significación del subanálisis

Mann-Whitney	TRANSFUSIONES					
	CD34	ENG>500PMN	ENG. PLAQ>25.000	GR	Concentrado plaquetario	Días de internación
U	10032	6772,5	5172,5	6914,5	12022,5	1698
P	0,00	0,00	0,00	0,477	0,829	0,00

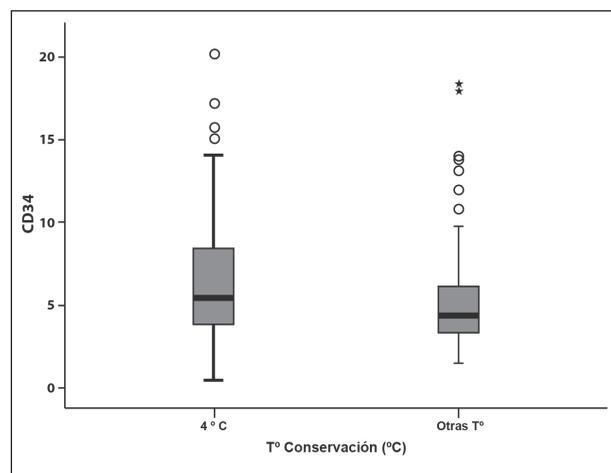


Figura 8. Resultados del sub análisis, de población contemporánea. N° de células CD34 infundidas.

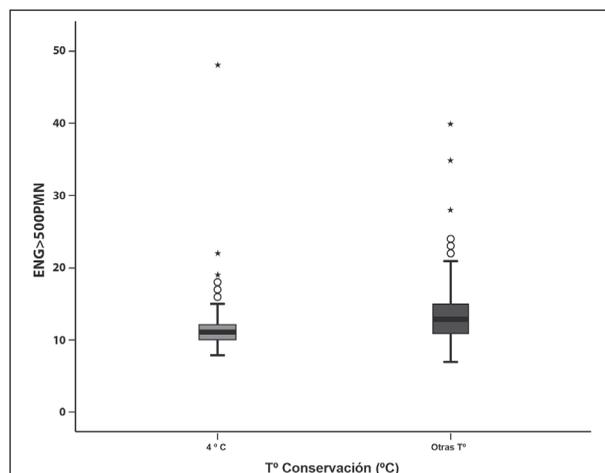


Figura 9a. Resultados del subanálisis de población contemporánea. Días al engraftment neutrófilo.

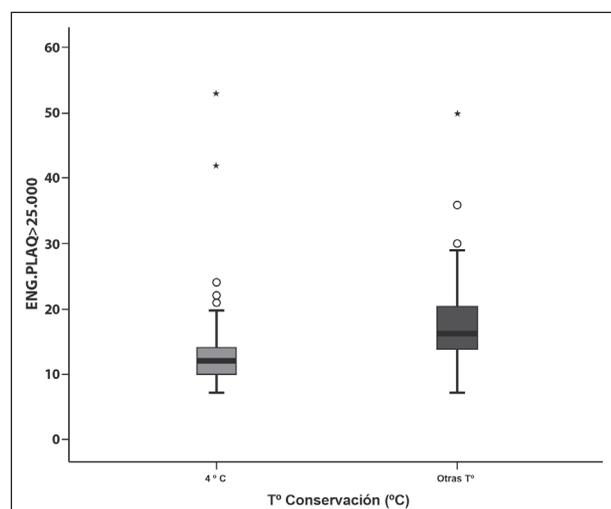


Figura 9b. Resultados del subanálisis de población contemporánea. Días al engraftment neutrófilo.

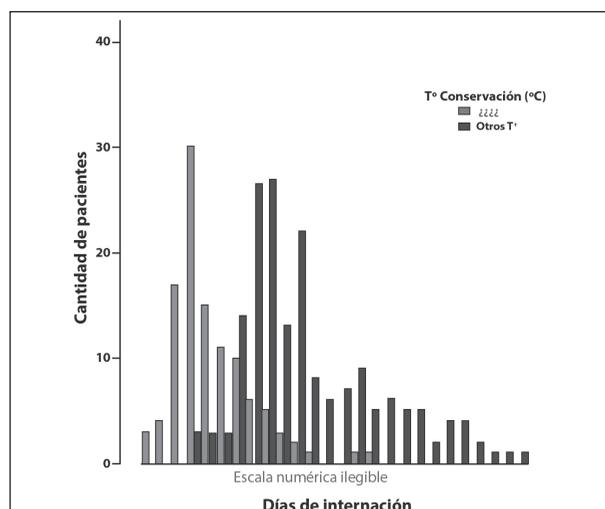


Figura 10. Resultados del subanálisis de población contemporánea. Días de internación.

Discusión

El trasplante autólogo como consolidación post tratamiento de inducción en MM para pacientes elegibles, menores de 65-70 años, en buen estado general, no frágiles y sin mayores comorbilidades, sigue siendo aún el tratamiento estándar a pesar del desarrollo de las nuevas drogas y de agentes biológicos incorporados en etapas precoces de la terapia⁽¹²⁻¹⁵⁾. La criopreservación a -80°C o -160°C de los PHSP recolectados luego de la movilización con G-CSF⁽¹⁶⁾, utilizando una mezcla crioprotectante que contiene dimetilsulfóxido (DMSO), es el procedimiento estándar para rescatar pacientes sometidos a altas dosis de quimioterapia. Sin embargo, los aditivos utilizados para realizar la mezcla crioprotectante, en particular DMSO^(17,18), son potencialmente tóxi-

cos. La incidencia global de toxicidad por DMSO de acuerdo a un relevamiento realizado por el EBMT⁽¹⁹⁾ (*European Group for Blood and Marrow Transplantation*) en 444 centros, mostró que 1:70 trasplantes presentaron efectos adversos vinculables al DMSO, siendo los más frecuentes los cardiovasculares (arritmia e hipotensión) y respiratorios. También han sido descritos náuseas, vómitos, escalofríos y fenómenos neurológicos⁽²⁰⁾ (amnesia global transitoria⁽²¹⁾) como efectos colaterales.

El régimen condicionante más utilizado en MM es M200mg/140mg (en caso de insuficiencia renal). Los estudios farmacocinéticos^(22,23) muestran que el MEL es una droga con una vida media de eliminación en plasma de 46 minutos (90 ± 57 minutos),

con el 11% de la droga recuperada en orina a las 24 horas (rápida descomposición química en orina). Esta característica de vida media corta y consecuente depuración muy rápida, permite implementar una técnica de conservación de PHSP a 4°C⁽²⁴⁻³²⁾ reinfundiéndolos entre 24 y 60 horas posteriores⁽³³⁾ a la administración de MEL, sin necesidad de manipular el inóculo, evitando así los riesgos de la mezcla crioprotectante y pérdida de progenitores y/o viabilidad con el procesamiento⁽³⁴⁾.

Nuestro estudio mostró ventajas de la técnica a 4°C en el número de células CD34 infundidas, *engraftment* de neutrófilos y plaquetas, días de internación, número de infecciones y MRT. Parece lógico asumir que la disminución de la cantidad de infecciones se relaciona al período más corto de neutropenia en el grupo A. El hecho de evitar manipular, congelar y descongelar el inóculo ahorra tiempo, dinero y disminuye el riesgo de contaminación y de pérdida celular⁽³⁵⁾. Si bien en este análisis retrospectivo no contamos con datos de viabilidad o cultivos celulares, la recuperación hematopoyética más precoz en el grupo A permitiría inferir que la no manipulación del inóculo redundaría en ventajas de supervivencia celular.

Parece probable que el acortamiento en el tiempo de internación influya favorablemente en la calidad de vida del paciente.

De acuerdo a los resultados obtenidos consideramos que hay suficiente evidencia para considerar la conservación a 4°C por sobre la criopreservación estándar cuando el régimen condicionante tiene un período de lavado (depuración) rápido, como MEL 140-200.

Conclusión

La conservación a 4°C es un procedimiento seguro, simple y de bajo costo por lo que podría constituir una mejor alternativa para trasplante de PHSP en pacientes con MM acondicionados con MEL.

Declaración de conflictos de interés:

Los autores declaran que no poseen conflictos de interés.

Bibliografía

- Gertz MA, Dingli D. How we manage autologous stem cell transplantation for multiple myeloma patients? *Blood*. 2014;124(6):882-90.
- Cavo M, Rajkumar SV, Palumbo A, y col. International Myeloma Working Group consensus approach to the treatment of multiple myeloma patients who are candidates for autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2011;117:6063-6073.
- San Miguel JF, Mateos MV, Ocio E y col. Multiple myeloma: treatment evolution. *Hematology*. 2012;(Suppl 1): S3-S6.
- Mohty M, Harousseau JL. Treatment of autologous stem cell eligible multiple myeloma patients: ten questions and answers. *Haematologica*. 2014;99(3):408-16.
- Guías de Diagnóstico y Tratamiento. Edición 2015. Sociedad Argentina de Hematología.
- Moreau P, Attal M, Facon T. Frontline therapy in multiple myeloma. *Blood*. 2015;125(20):3076-84.
- Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz Argüelles A, Pérez Romano B y col. Filgrastim-mobilized peripheral-blood stem cells can be stored at 4 degrees and used in autografts to rescue high-dose chemotherapy. *Am J Hematol*. 1995. Feb;48(2):100-103.
- Lasky LC, McCullough J, Zanjani ED. Liquid storage of unseparated human bone marrow. Evaluation of hematopoietic progenitors by clonal assay. *Transfusion*. 1986; Jul-Aug;26(4):331-4.
- Bullorsky E, Shanley C, Stemmelin G y col. Autotrasplante de stem cells hematopoyéticas criopreservadas a 4°C. Descripción de un método novedoso y sencillo para la consolidación quimioterapéutica post-inducción en pacientes con mieloma múltiple. XXI Congreso Argentino de Hematología, I Simposio conjunto Asociación Hematológica Europea (EHA) y Sociedad Argentina de Hematología (SAH). *Hematología*. 2013;17:154.
- Gertz MA, Kumar SK, Lacy MQ y col. Comparison of high-dose CY and growth factor with growth factor alone for mobilization of stem cells for transplantation in patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*. 2009;43(8): 619-625.
- Winkler IG, Lévesque JP. Mechanisms of hematopoietic stem cell mobilization: when innate

- immunity assails the cells that make blood and bone. *Exp Hematol.* 2006;34:996-1009.
12. Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P y col. Multiple Myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow Up. *Ann Oncol.* 2017 Jul 1;28(suppl_4).
 13. Raza S, Safyan RA, Rosenbaum E y col. Optimizing current and emerging therapies in multiple myeloma: a guide for the hematologist. *Ther Adv Hematol.* 2017 Feb;8(2):55-70.
 14. Jethava YS, van Rhee F. Transplantation for Multiple Myeloma. *Cancer Treat Res.* 2016;169:227-250.
 15. Terpos E. International Myeloma Society. Multiple Myeloma: Clinical Updates from the American Society of Hematology Annual Meeting 2016. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2017;17:329-339.
 16. Skopec B, Skerget M, Zontar D y col. Filgrastim-alone versus pegylated filgrastim-alone for autologous peripheral blood stem cells mobilization in newly diagnosed multiple myeloma patients. *Wien Klin Wochenschr.* 2017 Apr24.
 17. Stroncek DF, Fautsch SK, Lasky LC y col. Adverse reactions in patients transfused with cryopreserved marrow. *Transfusion.* 1991;31(6):521-6.
 18. Zambelli A, Poggi G, Da Prada G y col. Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion. *Anticancer Res.* 1998;18(6B):4705-8.
 19. Windrum P, Morris TC, Drake MB y col. EBMT Chronic Leukaemia Working Party Complications Subcommittee. Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres. *Bone Marrow Transplant.* 2005 Oct;36(7):601.
 20. Hoyt R, Szer J, Grigg A. Neurological events associated with the infusion of cryopreserved bone marrow and/or peripheral blood progenitor cells. *Bone Marrow Transplant.* 2000 Jun;25(12):1285-7.
 21. Otrrock ZK, Beydoun A, Barada WM y col. Transient global amnesia associated with the infusion of DMSO-cryopreserved autologous peripheral blood stem cells. *Haematologica.* 2008;93(3):e36-7.
 22. Nath CE, Shaw PJ, Trotman J y col. Population pharmacokinetics of melphalan in patients with multiple myeloma undergoing high dose therapy. *Br J Clin Pharmacol.* 2010 May;69(5):484-97.
 23. Moreau P, Kerqueris MF, Milpied N y col. A pilot study of 220 mg/m² melphalan followed by autologous stem cell transplantation in patients with advanced haematological malignancies: pharmacokinetics and toxicity. *Br J Hematol.* 1996 Dec;95(3):527-30.
 24. Donmez A, Cagirgan S, Saydam G y col. Overnight refrigerator storage of autologous peripheral progenitor stem cells without cryopreservation. *Transfusion and Apheresis Science.* 2007;36(3):313-319.
 25. Pettengell R, Woll PJ, O'Connor DA y col. Viability of haemopoietic progenitors from whole blood, bone marrow and leukapheresis product: effects of storage media, temperature and time. *Bone Marrow Transplant.* 1994 Nov;14(5):703-9.
 26. Cuellar-Ambrosi F, Karduss UA, Gomez wr y col. Hematologic reconstitution following high-dose and supralethal chemoradiotherapy using stored, noncryopreserved autologous hematopoietic stem cells. *Transplant Proc.* 2004 Jul-Aug;36(6):1704-5.
 27. Seo JY, Huh HJ, Park HK y col. Evaluation of overnight storage conditions for autologous peripheral blood stem cell products: comparison of three different conditions. *Vox Sang.* 2012Aug;103(2):150-8.
 28. Kao GS, Kim HT, Daley H y col. Validation of short-term handling and storage conditions for marrow and peripheral blood stem cell products. *Transfusion.* 2011 Jan;51(1):137-47.
 29. Wannesson L, Panzarella T, Mikhael J y col. Feasibility and safety of autotransplants with non-cryopreserved marrow or peripheral blood stem cells: a systematic review. *Annals of Oncology.* 2007;18(4):623-632.
 30. Kayal S, Sharma A, Igbal S y col. High-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: a single institution experience at All India Institute of Medical Sciences, New Delhi, using non-cryopreserved peripheral blood stem cells. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2014 Apr;14(2):140-7.
 31. Al-Anazi KA. Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Multiple Myeloma with-

- out Cryopreservation. Bone Marrow Res. 2012; 917361.
32. Ramzi M, Zakerinia M, Nourani H y col. Non-cryopreserved hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma, a single center experience. Clinical Transplantation. 2012;26(1):117-122.
33. Hechler G, Weide R, Heymanns J y col. Storage of noncryopreserved peripheral blood stem cells for transplantation. Annals of Hematology. 1996;72:303-306.
34. de Boer F, Drager AM, Pinedo HM y col. Extensive early apoptosis in frozen-thawed CD34-positive stem cells decreases threshold doses for haematological recovery after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. Bone Marrow Transplantation. 2002;29:249-255.
35. López-Otero A, Ruiz-Delgado GJ, Ruiz-Ar-güelles GJ. A simplified method for stem cell autografting in multiple myeloma: a single institution experience. Bone Marrow Transplantation. 2009;44(11):715-719.