

## **Trasplante de progenitores hemopoyéticos**

COORDINADORES: I. ESPIGADO. *Sevilla*  
M. JURADO. *Granada*

## IMPACTO CLÍNICO DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO

M. GRANELL

Servicio de Hematología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona

---

### Introducción

Dos individuos no familiares comparten alrededor del 99,9% de la secuencia de ADN. Dado que el genoma humano está compuesto por más de tres billones de pares de bases, el ADN de estos dos individuos diferirá "tal sólo" en unos pocos millones de pares de bases. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son variaciones en un único par de bases nitrogenadas en la secuencia del genoma que se encuentran presentes en, al menos, un 1% de la población normal<sup>1</sup>. Los SNP situados en los exones de los genes pueden dar lugar a un cambio de aminoácido en la secuencia de la proteína que codifican dichos genes. En cambio, los SNP situados en las regiones no codificantes pueden dar lugar a variaciones en la expresión de los genes. Durante los últimos años se ha intentado relacionar los SNP con la presencia de enfermedades o la respuesta a tratamientos en diversos ámbitos de la medicina, entre ellos en el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos (alo-TPH). Los SNP que tienen una mayor significación clínica en el alo-TPH son aquellos que forman parte del sistema mayor de histocompatibilidad o HLA. (La histocompatibilidad del receptor y el donante es vital para el éxito del trasplante y constituye un factor limitante para la realización del mismo; sin embargo, este aspecto del trasplante queda fuera del ámbito de esta revisión.)

En los últimos años se ha estudiado la relación de determinados SNP que no forman parte del sistema HLA con la evolución del alo-TPH. Entre ellos podemos diferenciar tres grandes grupos: SNP en genes de citocinas y sus receptores, SNP en genes que participan en el metabolismo de fármacos y SNP en genes de la inmunidad innata. A continuación se exponen algunos ejemplos de los dos primeros grupos y una revisión de los SNP en genes de la inmunidad innata y su relación con la evolución del trasplante.

---

### SNP en citocinas y sus receptores

Numerosos estudios han examinado el papel de polimorfismos en genes inmunorreguladores con la evolución del alo-TPH, revisado en<sup>2,3</sup>. Las citocinas pro y antiinflamatorias más frecuentemente estudiadas

han sido TNF, IL-1, IL-RN (que codifica el antagonista del receptor de IL-1), IL-2, IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$ . Las asociaciones que con más frecuencia se han analizado han sido la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) aguda, la mortalidad relacionada con el trasplante (MRT), la supervivencia libre de recaída (SLE) y la supervivencia global (SG). La mayoría de los estudios publicados se han llevado a cabo en cohortes relativamente pequeñas de pacientes, de uno o unos pocos centros y en trasplantes a partir de hermano HLA-idéntico<sup>4</sup>.

---

### SNP en el metabolismo de fármacos

La farmacogenómica examina la relación entre polimorfismos en enzimas metabolizadoras de fármacos con la farmacocinética, los efectos y la toxicidad de los medicamentos. En el ámbito del alo-TPH se ha estudiado la relación entre la farmacogenómica de algunos medicamentos utilizados en el acondicionamiento o en la profilaxis de la EICH con su toxicidad. Por ejemplo, el metotrexato es ampliamente utilizado como profilaxis de la EICH, sobre todo en regímenes de acondicionamiento mieloablativo. La metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es una enzima clave en el metabolismo del metotrexato que posee dos SNP, C677T y A1298C, que modifican la actividad de la enzima. Ulrich *et al.*<sup>5</sup> analizaron los genotipos C677T de la MTHFR en un grupo de pacientes que recibieron un alo-TPH con metotrexato y observaron que aquellos que presentaban el genotipo 677TT tenían más mucositis y necesitaban más tiempo para la recuperación plaquetaria después del trasplante.

---

### SNP en genes de la inmunidad innata

#### MBL2

MBL es una proteína plasmática perteneciente a la familia de las colectinas con capacidad de oligomerizarse y reconocer estructuras de carbohidratos (manosa, mucosa...) presentes en la superficie de diversos microorganismos. Una vez unido a su ligando, MBL activa la vía del complemento de manera independiente de la presencia de anticuerpos. En el gen MBL existen seis SNP, tres en la región promotora UTR5' (-551, -221 y +4) y tres en la región codificante, en los codones 52, 54 y 57. Los individuos con las formas variantes del gen *MBL* ven significativamente disminuidos los niveles plasmáticos funcionales de la proteína MBL. Aproximadamente un tercio de la población caucásica tiene genotipos de *MBL* que se asocian a niveles bajos de la proteína, y un 5% con niveles muy bajos. El déficit de MBL es la principal causa de inmunodeficiencia<sup>6</sup>.

**Tabla 1. Estudios de asociación de SNP en MBL2 en alo-TPH**

Autor/año	N	Tipo TPH	SNP estudiados	Asociación
Mullighan/027	97	Familiar HLA id.	-550, -221, 52, 54, 57	Infección grave
Rocha/028	107	Hermano HLA id.	52, 54, 57	No asociación con infección
Granel/069	106	Hermano HLA id.	-550, -221, 52, 54, 57	Infección fúngica invasora
Mullighan/0810	142	Hermano HLA id. (59 alo-TIR)	-550, -221, 52, 54, 57	Infección grave

HLA id.: HLA idéntico; alo-TIR: trasplante de intensidad reducida.

En el ámbito del alo-TPH, algunos estudios han analizado la influencia de los polimorfismos en *MBL* en la incidencia de complicaciones infecciosas, con resultados discordantes. Mullighan *et al.*<sup>7</sup> estudiaron el genotipo de *MBL* en 97 parejas paciente-donante que recibieron un alo-TPH por diferentes enfermedades hematológicas a partir de un donante familiar. El régimen de acondicionamiento era mieloablativo en todos los casos. En dicho estudio se definía como infección grave una infección microbiológicamente documentada sistémica, invasiva o rápidamente progresiva. Se estudiaron los SNP en la región promotora y en el primer exón del gen *MBL*. Los autores observaron un mayor riesgo de infección grave en aquellos pacientes con genotipos deficientes en *MBL*. Rocha *et al.*<sup>8</sup> sobre un grupo de 107 parejas paciente-donante trasplantados a partir de hermano HLA idéntico con acondicionamiento mieloablativo, no encontraron asociación entre los SNP en el primer exón de *MBL* y la incidencia de infecciones víricas, bacterianas o fúngicas. En dicho trabajo no se estudiaron los polimorfismos en la región promotora. Nuestro grupo observó una mayor incidencia de infección fúngica invasiva en aquellos pacientes trasplantados que presentaban las formas variantes de *MBL*, tanto a nivel del promotor como del primer exón<sup>9</sup>. En un nuevo estudio prospectivo, Mullighan *et al.*<sup>10</sup> observaron que el impacto de los SNP en

*MBL* en la incidencia de infecciones se limitaba únicamente a los pacientes que recibían un alo-TPH con intensidad de acondicionamiento mieloablativo con irradiación corporal total.

## NOD2

Nod2 es una proteína citoplasmática que participa en el mantenimiento de la homeostasis de la flora intestinal. Reconoce el MDP, un componente del peptidoglicano presente en la pared de bacterias tanto grampositivas como gramnegativas. Al unirse a su ligando, Nod2 se oligomeriza y activa la vía de señalización de NF- $\kappa$ B que, a su vez, promueve la transcripción de numerosos genes que codifican citocinas inflamatorias<sup>11</sup>. Nod2 se expresa, en condiciones normales, en células mieloides y en las células de Paneth del epitelio intestinal. Se ha implicado a los SNP R702W (SNP 8), G908R (SNP12) y L1007insC (SNP13) en la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal<sup>12</sup>.

En las primeras fases del desarrollo de la EICH, el daño tisular provocado por la quimioterapia y la radioterapia sobre el tubo digestivo facilita la translocación bacteriana. Se ha observado que la descontaminación intestinal es un factor protector de la EICH<sup>13</sup>. En este sentido, la disfunción de Nod2, que participa en la pri-

**Tabla 2. Estudios de asociación de SNP en NOD2 en alo-TPH**

Autor/año	N	Tipo TPH	Asociación
Holler/0414	169	Hermano HLA id. y DNE (40% alo-RIC)	MRT EICHa
Holler/0615	303	Hermano HLA id.	MRT SG
Granel/0616	85	Hermano HLA id. DLT	SLE
Mayor/0817	196	alo-DNE por LA (83% DLT)	Recaída SG
Sairafi/0818	198	Familiar, DNE	No asociación con EICH ni MRT

HLA id.: HLA idéntico. DNE: donante no emparentado. alo-TIR: trasplante de intensidad reducida. MRT: mortalidad relacionada con el trasplante. SG: supervivencia global. DLT: depleción linfóide T. SLE: supervivencia libre de enfermedad. LA: leucemia aguda. EICH: enfermedad del injerto contra el huésped.

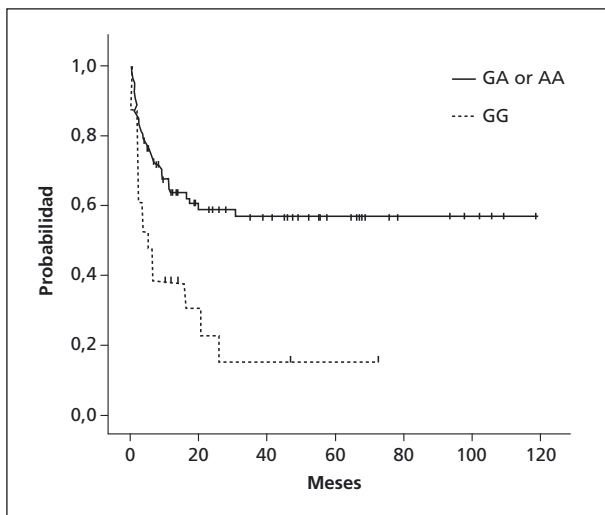


Figura 1. Supervivencia global según el genotipo NLRP2 rs1043684 del donante. N = 116, GG 15% vs. GA/AA 57% (P = .001).

mera línea de defensa frente a los microorganismos intestinales, podría tener un papel importante en el desarrollo de la EICH.

Holler *et al.*<sup>14</sup> analizaron la influencia de los SNP en *NOD2* en un grupo heterogéneo de 169 pacientes sometidos a alo-TPH. Observaron una mayor incidencia de EICH aguda grave y una mayor MRT cuando los pacientes o sus donantes presentaban las formas variantes de *NOD2*. Posteriormente, los mismos autores han confirmado los hallazgos en una serie de más de trescientos trasplantes a partir de hermano HLA-idéntico, un tercio de ellos de intensidad reducida<sup>15</sup>. En el segundo trabajo, los autores observaron una clara asociación de los SNP en *NOD2* presentes en el donante o el paciente con la SG. El impacto de los polimorfismos en *NOD2* en EICH aguda y MRT se observó únicamente en aquellos pacientes que no habían recibido descontaminación intestinal para gérmenes grampositivos. En consecuencia, los autores concluían que las bacterias grampositivas podrían tener un papel relevante en la activación de la inflamación mediada por Nod2. De forma interesante, en ambos estudios la causa de muerte en los pacientes con SNP en *NOD2* es EICH aguda, como era esperable, pero también de insuficiencia respiratoria primaria o secundaria. En un grupo de pacientes sometidos a alo-TPH con depleción CD34 positiva, esta modalidad de trasplante se caracteriza por una muy baja incidencia de EICH aguda grave, y se observa una asociación entre los SNP en *NOD2* con la supervivencia libre de progresión<sup>16</sup>. Estos resultados orientan hacia un efecto deletéreo de los SNP en *NOD2* al margen de sus efectos sobre la EICH aguda. Por otra parte, Mayor *et al.*,<sup>17</sup> sobre una cohorte de pacientes trasplantados a partir de donante no em-

parentado por leucemia aguda, observaron que aquellos que presentaban SNP en *NOD2* tenían una menor SG debido a una mayor recaída, sugiriendo un efecto de injerto contra leucemia relacionado con *NOD2*. En algunos estudios no se ha observado asociación entre los SNP en *NOD2* y la evolución del trasplante<sup>18</sup>.

### Inflamosoma

Los inflamosomas son complejos citosólicos de macromoléculas implicados en la producción de IL-1 e IL-18 en respuesta a diferentes estímulos derivados de patógenos<sup>19</sup>. Las interleucinas anteriormente citadas están implicadas en la patogenia de la EICH. Nuestro grupo analizó la asociación entre 14 SNP frecuentes presentes en cinco genes que forman parte del inflamosoma (*NLRP1*, *NLRP2*, *NLRP3*, *CARD8* y *CASP5*) y la evolución del trasplante en un grupo de 133 pacientes que recibieron un alo-TPH de hermano HLA idéntico en el Hospital Clínic de Barcelona. La presencia del genotipo TT en el donante en el locus rs10925027 del gen *NLRP3* se asoció con la recaída. Asimismo, el genotipo GG en el donante en el locus rs1043684 del gen *NLRP2* se asoció con MRT y SG (Figura 1)<sup>20</sup>.

### Conclusiones

En el ámbito de los polimorfismos de genes implicados en la inmunidad innata se puede concluir que: a) los SNP en la región promotora y en el primer exón del gen *MBL* se relacionan con una mayor incidencia de infecciones en pacientes que reciben un alo-TPH con un régimen de acondicionamiento mieloablativo con irradiación corporal total, aunque ello no parece traducirse en una mayor mortalidad; b) los SNP en *NOD2* parecen relacionarse con una menor supervivencia que pudiera deberse a una mayor EICH aguda, a complicaciones pulmonares o a una mayor recaída; y c) algunos SNP en genes que forman parte del inflamosoma, concretamente *NLRP3* y *NLPR2*, podrían asociarse a recaída o MRT, respectivamente. En el caso de *NLPR2* podría existir también relación con la SG.

Numerosos estudios han relacionado la presencia de variaciones genéticas con la evolución del alo-TPH, principalmente con recaída, EICH aguda, MRT y supervivencia. Son menos frecuentes las asociaciones con infecciones y EICH crónica. La mayoría de dichos estudios se han limitado a relativamente pocos SNP en genes que se han implicado en la patogenia de complicaciones del trasplante. La mayoría de estos estudios se han realizado en grupos relativamente pequeños de pacientes, cosa que dificulta la realización de análisis multivariantes que puedan incluir factores de riesgo clínicos y biológicos.

## Bibliografía

1. Gutmacher AE, Collins FS. Genomic medicine: a primer. *N Engl J Med* 2002; 347 (19): 1512-20.
2. Barret AJ, Rezvani K, Solomon S, Dickinson AM, Wang XN, Strak G, et al. New developments in allotransplant immunology. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003; 350-71.
3. Mullighan CG, Bardy PG. New directions in the genomics of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007; 13: 127-44.
4. Dickinson AM, Middleton PG, Rocha V, Gluckman E, Holler E. Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants. *Br J Haem* 2004; 127: 479-90.
5. Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, Schubert MM, Wagner JL, Bigler J, et al. Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylentetrahydrofolatereductase C677T polymorphism. *Blood* 2001; 98: 231-4.
6. Jack DL, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol Rev* 2001; 180: 86-99.
7. Mullighan CG, Heatley S, Doherty K, Szab F, Grigg A, Hughes TP, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with major infection following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2002; 99: 3524-9.
8. Rocha V, Franco RF, Porcher R, Bittencourt H, Silva WA, Latouche A, et al. Host defense and inflammatory gene polymorphisms are associated with outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 2002; 100: 3908-18.
9. Granell M, Urbano-Ispizua A, Suárez B, Rovira M, Fernández-Avilés F, Martínez C, et al. Mannan-binding lectin pathway deficiencies and invasive fungal infections following allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hem* 2006; 34: 1435-41.
10. Mullighan CG, Heatley SL, Danner S, Dean MM, Doherty K, Hahn U, et al. Mannose-binding lectin status is associated with risk of major infection following myeloablative sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2008; 112: 2120-8.
11. Maeda S, Hsu LC, Liu H, Bankston LA, Iimura M, Kagnoff MF, et al. NOD2 mutation in Crohn's disease potentiates NF- $\kappa$ B activity and IL-1 $\beta$  processing. *Science* 2005; 307: 734-8.
12. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603.
13. Beleen DW, Haralambie E, Brandt H, Linzenmeier G, Müller KD, Quabeck K, et al. Evidence that sustained growth suppression of intestinal anaerobic bacteria reduces the risk of acute graft-versus-host disease after sibling marrow transplantation. *Blood* 1992; 80: 2668-76.
14. Holler E, Rogler G, Herfarth H, Brenmoehl J, Wild PJ, Hahn J, et al. Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2004; 104: 889-94.
15. Holler E, Rogler G, Brenmoehl J, Hahn J, Greinix H, Dickinson AM, et al. Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect of long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination. *Blood* 2006; 107: 4189-93.
16. Granell M, Urbano-Ispizua A, Aróstegui JI, Fernández-Avilés F, Martínez C, Rovira M, et al. Effect of NOD2/CARD15 variants in T-cell depleted allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2006; 91: 1372-76.
17. Mayor NP, Shaw BE, Hughes DA, Maldonado-Torres H, Madrigal JA, Keshav S, et al. Single nucleotide polymorphisms in the NOD2/CARD15 gene are associated with an increased risk of relapse and death for patients with acute leukaemia after hematopoietic stem cell transplantation with unrelated donors. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4262-9.
18. Sairafi D, Uzunel M, Remberger M, Ringdén O, Mattsson J. No impact of NOD2/CARD15 on outcome after SCT. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 961-4.
19. Drenth JPH, van der Meer JWM. The inflammasome: a line-backer of innate defense. *New Engl J Med* 2006; 355: 730-2.
20. Granell M, Urbano-Ispizua A, Pons A, Aróstegui JI, Gel B, Navarro A, et al. Common variants in NLRP2 and NLRP3 genes are strong prognostic factors for the outcome of HLA-identical sibling allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2008; 112: 4337-42.

## CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN HAEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATIONS

I. GRACIA-AHUFINGER<sup>1</sup>,  
F. DE LA CRUZ-VICENTE<sup>2</sup>, I. ESPIGADO-  
TOCINO<sup>2</sup>, O.J. BENMARZOUK-HIDALGO<sup>1</sup>,  
J. MIER-MOTA<sup>1</sup>, J.M. CISNEROS-HERREROS<sup>1</sup>,  
Á. URBANO-ISPIZUA<sup>2</sup>, P. PÉREZ-ROMERO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Service of Infectious Diseases

<sup>2</sup>Service of Haematology and Haemotherapy

Hospitales Universitarios Virgen del Rocío. Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). Sevilla, Spain

### Introduction

Cytomegalovirus (CMV) infection continues to be an important cause of morbidity and mortality for solid organ transplantation (SOT) and haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) recipients<sup>1</sup>. Serologically CMV positive HSCT recipients with a negative donor (D-/R+) are at especially high risk for CMV infection, since specific immune effectors, depleted by the conditioning regimen cannot be adequately restored by the donor graft. Allogeneic haematopoietic transplants are considered of higher risk in the following cases: T-cell depletion, non related graft, non identical HLA, use of high dose of corticoids and conditioning based on antilymphocytic globulin, alemtuzumab or purine analogs<sup>2</sup>.

Two major factors are essential in order to control the infection, the detection of CMV replication and the generation of a CMV specific immune response. Without intervention, the majority of CMV replication and disease occurs early during the first three months post-transplantation, during the administration of the most intense immunosuppressive treatment<sup>3</sup>. Successful long-term prevention of CMV disease requires the generation of a CMV-specific T cell

response acquired after the recognition of CMV antigens by the patient immune response<sup>4</sup>. After antigenic stimulation, naive T cells proliferate and differentiate in memory cells that will protect during later CMV reactivation. CMV specific T cells, CD4+ and CD8+, are characterized by their ability to secrete IFN $\gamma$  after CMV antigen stimulation. Measuring CMV-specific T cells allows for the detection of an adaptive immune response to CMV<sup>5</sup>.

The development of antiviral strategies has resulted in a large decrease in the incidence of CMV disease. Currently, two strategies are used to treat CMV infection after transplantation, preemptive therapy and prophylaxis, and both have been shown to be very similar in efficacy<sup>6,7</sup>. In the prophylaxis strategy, patients receive continuous treatment of valganciclovir during three months after transplantation, preventing CMV viremia and disease. This approach has several disadvantages: higher risk for late-onset CMV disease, selection of ganciclovir resistance mutations, development of side effects and a delay in eliciting a CMV-specific immune response. Allograft rejection was found to be strongly associated with the occurrence of late-onset CMV disease<sup>8</sup>. This is particularly important in allogeneic HSCT recipients where the mortality rate from late-onset CMV disease is notably high<sup>9</sup>. Furthermore, prophylaxis with ganciclovir may expose a significant proportion of patients who would never have developed disease to a prolonged course of antiviral therapy. This is of particular importance since ganciclovir treatment has severe side effects such as neutropenia.

In the preemptive strategy treatment is initiated as soon as CMV replication reaches an established threshold<sup>10</sup> and it is discontinued when CMV replication decreases under the limit of detection. This approach reduces the use of antivirals, preventing side effects. In addition, it does not promote the selection of resistant strains<sup>11</sup>. The short periods of viral replication may allow for the stimulation of a CMV specific immune response, which may prevent late-onset disease. Indeed, subclinical viremia, if promptly aborted, and viral replication that is not allowed to progress to prolonged or sustained CMV viremia are not associated with suboptimal outcomes<sup>12</sup>.

For the preemptive administration of ganciclovir it is essential to use a sensitive and specific method to detect CMV replication to tightly control virus replication to prevent long periods of low level CMV replication<sup>13</sup>. In our laboratory we have optimized a molecular approach involving a real time polymerase chain reaction (rt-PCR) that is particularly sensitive for monitoring early CMV replication compared to antigenemia. Our results showed that rt-PCR technique was able to detect primary CMV infection in 46% of the tested samples while antigenemia only de-

tected it in 7% of samples<sup>14</sup>. Our results suggest that this rt-PCR method is more sensitive for the detection of CMV replication and would therefore be a useful method for guiding treatment.

Based on previous results in solid organ transplant patients we have prospectively monitored HSCT recipients receiving pre-emptive treatment. The goal of this study was to evaluate the administration of pre-emptive treatment, while monitoring for CMV replication with a sensitive real time PCR technique to successfully control CMV infection. Furthermore we have monitored lymphocyte reconstitution after HSCT and measured CMV-specific T-cell response to determine immune protection against CMV.

---

## Design and methods

### *Patients and samples*

We performed a prospective study of all consecutive patients over the age of 16 undergoing unmanipulated allogeneic HSCT at the University Hospital Virgen del Rocío, from April 2008 to May 2009. All patients gave informed consent. The follow up schedule, beginning two weeks after transplant, was as follows: weekly for the first three months and every other week between months three and six. The study was approved by the institutional ethical committee.

### *Clinical management*

Patients in this study were pre-emptively treated guided by the rt-PCR results. Ganciclovir i.v. (5mg/kg/12h) or oral Valganciclovir (900 mg/12h) was administered when the viral load was higher than 1,000 copies/ml and it was continued for two weeks or until CMV viral load reached the lower detection limit of the real time PCR test. CMV infection and disease were defined as described by Ljungman *et al*<sup>15</sup>.

Prophylaxis for graft versus host disease (GvHD) consists of cyclosporine A and methotrexate (CsA/MTX) or CsA and mycophenolate mofetil (MMF). Patients were treated with prednisone (2 mg/kg/day).

### *CMV DNA extraction and rt-PCR*

Viral DNA was extracted from 200  $\mu$ l of plasma using the Affigene DNA Extraction assay (Cepheid AB, Bromma, Sweden) according to the manufacturer's instructions. Twenty-five microliters of eluted DNA were used for rt-PCR using the Affigene CMV Trender diagnostic assay (Cepheid AB, Bromma, Swe-

den)<sup>14</sup>. Amplification was performed on a MX3000P instrument (Stratagene Instruments Systems, La Jolla, CA, USA). Viral loads were obtained using the Affigene Analysis software.

### Flow cytometry

The frequency of CMV-antigen-specific IFN $\gamma$ -producing T-cells by intracellular cytokine staining was carried out as follows. Blood was collected in Na-heparin anti-coagulated-vacutainers (Becton Dickinson, Allschwil, Switzerland). To induce antigen-specific activation and cytokine induction, 1 ml of whole peripheral blood was incubated in the presence of 10  $\mu$ g/ml of  $\alpha$  CD28/ $\alpha$  CD49d (1  $\mu$ g/ml, Becton Dickinson NJ USA). To test for T-cell response the preparation was stimulated with 50  $\mu$ g/ml of CMV infected human foreskin fibroblast lysates (Advanced Biotechnologies Inc, Columbia, MD, USA). As positive controls, samples were stimulated with 25 ng/ml of 4-alpha-phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and 1.5  $\mu$ g/ml of *Streptomyces* ionomycin calcium salt (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland). Unstimulated preparations served as negative controls. After two hours, brefeldin A (10  $\mu$ g/ml, Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland) was added to prevent IFN $\gamma$  and IL-4 secretion and was incubated for four hours at 37°C. Adherent cells were eliminated by adding 100  $\mu$ l of 0.5 M EDTA and incubating for 15 minutes at room temperature. Peripheral blood mononuclear cells were washed for 15 minutes in BD lysing solution to recover the leucocyte population. Cells were washed twice with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde, then with 1% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% saponin (Sigma-Aldrich Buchs, Switzerland) in PBS and stained at room temperature in the dark with the following antibodies:  $\alpha$  CD3,  $\alpha$  CD4,  $\alpha$  CD8,  $\alpha$  CD69 and  $\alpha$  IFN $\gamma$ -IL-4, (all Becton-Dickinson, NJ USA). Among 15,000-30,000 CD3+ lymphocytes were analyzed on a FACSCanto (Becton-Dickinson, NJ USA). The frequency of CMV-specific T-cells was analyzed for each antigen and was expressed as the percentage of CD69 and IFN $\gamma$  double positive CD4+CD3+ or CD8+CD3+ cells. Negative controls were subtracted to determine the antigen-specific frequency. A sample was considered positive when the percentage of T-cells positive for CD69 was over 0.25%, and over 1% were positive for IFN $\gamma$ .

### Statistical analysis

CMV viral loads and the decrease of CMV viral load during treated replication episodes were compared by

the Wilcoxon test. Differences were considered statistically significant for p values < 0.05. SPSS 14.0 software (SSPS Inc., Chicago, IL) was used to perform all statistical analysis.

## Results

### Patients

From April 2007 to May 2008, ten cases met the requirements for inclusion in the study. Clinical data from patients included are shown in Table 1. The median age was 34 with a range of 17-59. Five out of the eight cases with acute evolved to chronic GvHD. The pre-transplant conditioning treatment was non-mieloablative in 40% of the patients.

### Characterization of viral replication

Replication episodes first occurred in five of the recipients between days 7 and 63 post-transplant, with a median of 35 days. All but one of the episodes showed viral load values below 1,000 copies/ml (Figure 1A). Six of the HSCT recipients had another period of CMV replication between days 77 and 119 post-transplant, with a median of 84 days. Of those, only two had viral load values over 10,000 copies/ml. After day 105, there were no CMV replication event over 10,000 copies/ml, and during this time, only one patient presented viral load values over 1,000 copies/ml (Figure 1A).

Only one recipient never developed viral infection. For the other patients, viral load was detected at median day 56 post-transplantation with viral load below 10,000 copies/ml, and only two patients with levels over 1,000 copies/ml (Figure 1B).

### Pre-emptive treatment administration and CMV disease

There were a total of 9 replication episodes over 1,000 copies/ml that needed treatment. The treatment was administered for a total of 343 days; each replication episode lasted an average of 38.1 days ( $\pm$ 12.1 days). The reduction in viral load during treatment is described in Figure 2. The median reduction in viral load compared to the value at the initiation of the treatment, at day 1, was significant after four weeks of treatment with a median reduction of 3.27 log<sub>10</sub> copies/ml (IQR: 0-2.3; p<0.05).

No side effect requiring the interruption of treatment was observed in any of the patients during valganciclovir therapy. During the six months follow up one of the patients (10%) developed CMV disease (Table 1) completely recovering after treatment.

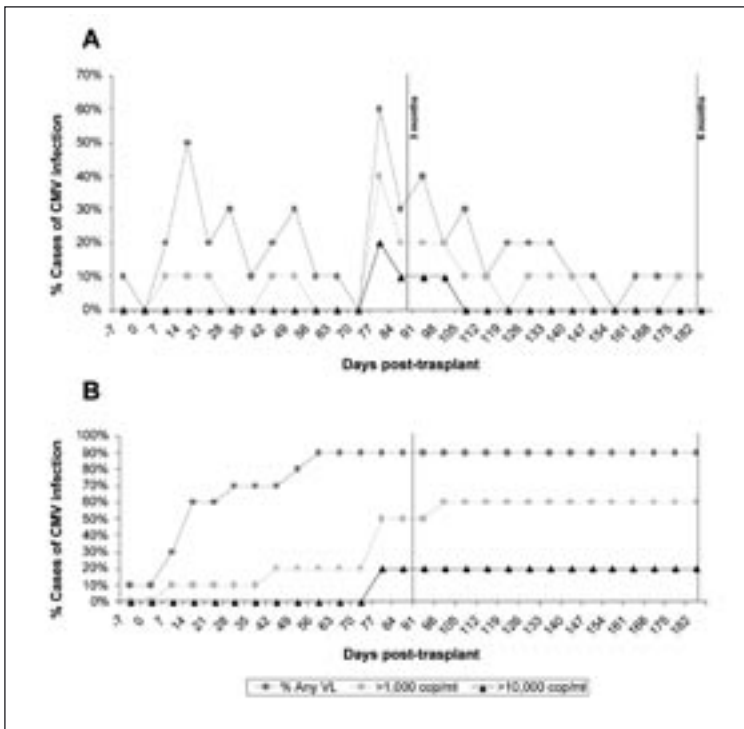


Figure 1. CMV infection time course during the first six months after transplantation. A. Percentage of cases of CMV infection determined by real-time PCR. B. Time to first detection of CMV infection measured by real-time PCR results.

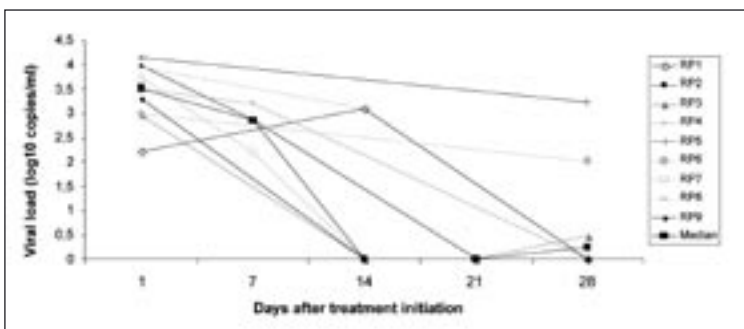


Figure 2. Evolution of CMV viral load during replication episodes that needed valganciclovir administration. Notes: RP, replication episode. \* Statistically significant  $p < 0.05$  compared to the first day of treatment; Wilcoxon test.

**Lymphocyte reconstitution and activation of the specific T-cell immune response**

In order to determine the optimal conditions for characterizing the immune response during the first six months after the transplant we followed one patient by measuring during CMV replication events reconstitution of the lymphocyte population and the activated T-cell subpopulations that produced  $IFN\gamma$  against CMV antigens.

As shown in Figure 3A this patient experienced two replication episodes that needed to be treated. At 35

days post-transplantation the total number of lymphocytes reached  $200\text{ cells}/\mu\text{l}$ , a count sufficient for analyzing between 15,000-30,000  $CD3+$  lymphocyte events by flow cytometry. The total number of lymphocytes further increased reaching a maximum of  $1400\text{ cells}/\mu\text{l}$  at day 98 after transplant (Figure 3 B-C). After day 98 the level of lymphocytes decreased which correlated with an episode of CMV replication that required the administration of valganciclovir. We first detected  $CD4+$  and  $CD8+$  positive for  $CD69$  at day 42 after the transplant, but only  $CD4+$  cells were expressing  $IFN\gamma$ . We first detected  $CD8+$  cells producing  $IFN\gamma$  at day 98 after the transplant indicating that at this point the patient had acquired specific immunity against CMV.

**Discussion**

CMV infection is one the major cause of morbidity and mortality after HSCT. Episodes of prolonged activation of CMV replication and also multiple replication episodes can contribute to increase the morbidity in these patients<sup>16</sup>.

Pre-emptive treatment has several advantages over prophylactic treatment, one of which is that only patients who develop infection are treated, preventing unnecessary treatment<sup>10,14</sup>. Furthermore, it may promote the acquisition of a CMV specific immune response. In addition, the antiviral treatment administration period is shorter, which may help to prevent the selection of resistance mutations and decrease valganciclovir side effects such as leucopenia, which is especially critical for HSTC patients<sup>9,10</sup>. Monitoring CMV infection remains essential for efficiently managing transplant recipients, especially those receiving pre-emptive therapy.

Our data suggest that pre-emptive administration of valganciclovir in HSCT patients guided by a real-time PCR method is a good alternative for patient management. Pre-emptive therapy ensures that treatment is only administered to patients who develop CMV infection, preventing overtreatment and maximizing cost-benefit.

The reconstitution of the CMV specific T cell immune response is one of the major risk factors associated with the development of CMV disease after

Table 1. Clinical data of patients receiving allogeneic Haematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT)

Patient	Age	Sex	Indication for HSCT	HSC source	Donor	Conditioning regimen	Prophylaxis GvHD	Acute GvHD (degree)	Chronic GvHD (degree)	CMV disease	CMV serology R/D
1	17	F	AML M6	UCB	Unrelated	Busulphan Thiotepa Fludarabine ATG	CsA MMF	Yes (II)	Yes (local)	No	+/U
2	31	M	CML	PB	Unrelated	TBI Cyclophosphamide	CsA MTX	Yes (II)	Yes (extended)	No	+/+
3	34	M	AML t(8:21)	PB	Related HLA identical	Busulphan Cyclophosphamide	CsA MTX	Yes (II)	Yes (local)	No	U/+
4	59	M	AML M2	PB	Unrelated	Fludarabine Melphalan	CsA MMF	Yes (II)	No	No	U/U
5	55	M	AML secondary to chemotherapy	PB	Unrelated	Fludarabine Busulphan	CsA MMF	Yes (I)	Yes (extended)	No	+/U
6	29	F	T lymphoblastic lymphoma	PB	Related HLA identical	Fludarabine Melphalan	CsA MTX	Yes (I)	No	No	+/+
7	34	F	AML M1	PB	Unrelated	Busulphan Cyclophosphamide	CsA MTX	Yes (I)	No	No	-/-
8	35	M	AML M4	PB	Related HLA identical	IDICE + Melphalan	CsA MMF	No	No	No	+/-
9	36	M	ALL B	PB	Unrelated	Busulphan Cyclophosphamide	CsA MTX	Yes (IV)	Yes (extended)	Yes	U/+
10	33	F	ALL B	PB	Related HLA identical	TBI Cyclophosphamide	CsA MTX	No	No	No	+/+

NOTES: F: Female; M: Male; CML: Chronic Myelogenous Leukemia; AML: Acute Myelogenous Leukemia; ALL B: Acute lymphoblastic leukemia type B; UCB: Umbilical cord blood; PB: peripheral blood; ATG: Anti-thymo-globulin; TBI: total body irradiation; R/D: Recipient/Donor; U: Unknown; CsA, cyclosporine A; MMF, mycophenolate mofetil; MTX: methotrexate.

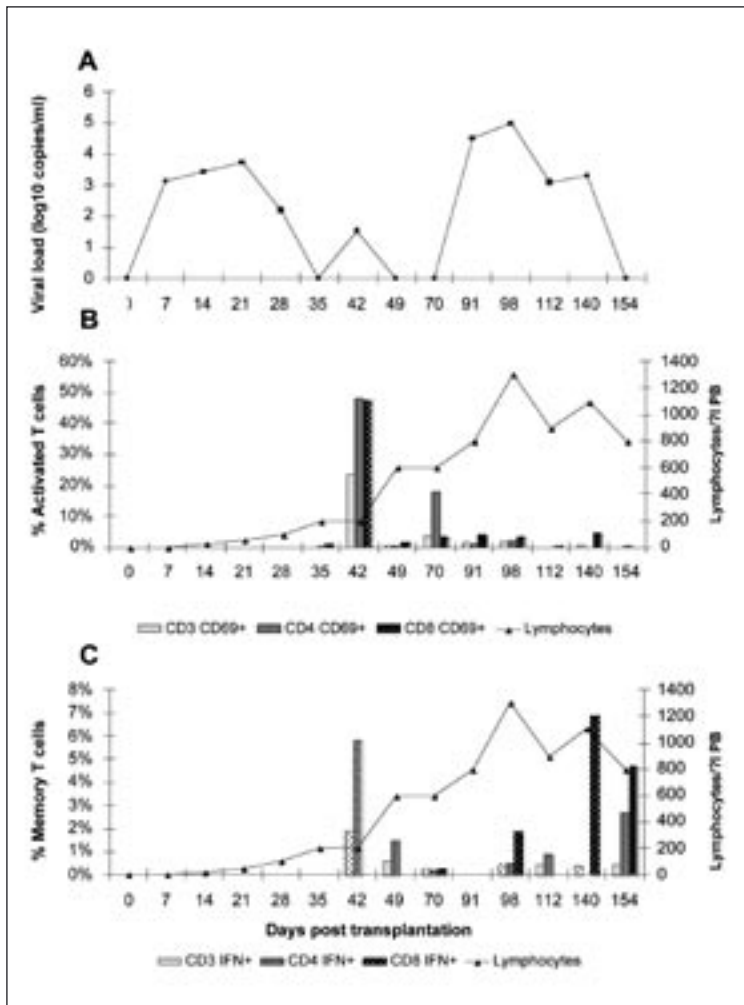


Figure 3. Lymphocyte reconstitution and activation of the specific T-cell immune response during the first six months after transplant. A. CMV replication events measured by rt-PCR. B. Detection of CD4+ and CD8+ positive for CD69 compared to lymphocyte population. C. Detection of CD4+ and CD8+ positive for IFN $\gamma$  compared to lymphocyte population. Notes: PB, peripheral blood.

transplant<sup>4</sup>. The preconditioning regimen for HSCT produces the depletion of the bone marrow allowing for the allograft implant. After transplant, the hematological reconstitution in HSCT patients begins 10 to 14 after infusion and the immunological reconstitution of T-cells and B-cells takes place around six months after the transplant<sup>17</sup>. Our results show that in patients undergoing HSCT the total leukocytes reconstitution kinetics, and in particular the peripheral blood lymphocytes, are limiting factors in the detection of the CMV specific immune response by flow cytometry. In one of the cases shown, CMV specific T-cells were detected 14 weeks after HSCT. It has been shown that the CMV specific immune response reconstitution early after the transplant correlated with a protection against the late-onset CMV reactivation, in patients after solid organ transplantation<sup>17</sup> and in patients after

HSCT<sup>18</sup>. On the other hand, it has been established that lymphopenia is a predicting factor for CMV replication after the transplant that could be used as a surrogate marker of a poor specific immune response in those situations in which the technology to determine the specific immune response is not available<sup>19</sup>.

In summary, pre-emptive therapy guided by rt-PCR was effective in preventing CMV disease during the first six months after HSCT. In this setting, measuring CMV-specific T cells for the detection of the adaptive immune response could be useful in the management of CMV infection.

## References

1. Bennekov T, Spector D, Langhoff E. Induction of immunity against human cytomegalovirus. *Mt Sinai J Med* 2004; 71: 86-93.
2. Hebart H, Brugger W, Grigoleit U, Gscheidle B, Loeffler J, Schäfer H, et al. Risk for cytomegalovirus disease in patients receiving polymerase chain reaction-based preemptive antiviral therapy after allogeneic stem cell transplantation depends on transplantation modality. *Blood* 2001; 97: 2183-5.
3. Legendre C, Pascual M. Improving outcomes for solid-organ transplant recipients at risk from cytomegalovirus infection: late-onset disease and indirect consequences. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 732-40.
4. Hakki M, Riddell SR, Storek J, Carter RA, Stevens-Ayers T, Sudour P, et al. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy and subclinical reactivation. *Blood* 2003; 102: 3060-67.
5. Moss P, Khan N. CD8(+) T-cell immunity to cytomegalovirus. *Hum Immunol* 2004; 65: 456-64.
6. Khoury JA, Storch GA, Bohl DL, Schuessler RM, Torrence SM, Lockwood M, et al. Prophylactic versus preemptive oral valganciclovir for the management of cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2006; 6: 2134-43.
7. Reischig T, Jindra P, Hes O, Svecova M, Klaboch, Treska V. Valacyclovir prophylaxis versus preemptive valganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 69-77.
8. Razonable RR, Rivero A, Rodríguez A, Wilson J, Daniels J, Jenkins G, et al. Allograft rejection predicts the occurrence of late-onset cytomegalovirus (CMV) disease among CMV-mismatched solid organ transplant patients receiving prophylaxis with oral ganciclovir. *J Infect Dis* 2001; 184: 1461-4.
9. Hebart H, Einsele H. Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation. *Hum Immunol* 2004; 65: 432-6.
10. Khoury JA, Storch GA, Bohl DL, Schuessler RM, Torrence SM, Lockwood M, et al. Prophylactic versus preemptive oral ganciclovir for the management of cytomegalovirus in-

- fection in adult renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2006; 6: 2134-43.
11. Emery VC, Griffiths PD. Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 8039-44.
  12. Singh N. Preemptive therapy versus universal prophylaxis with ganciclovir for cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 742-51.
  13. Len O, Gavalda J, Aguado JM, Borrell N, Cervera C, Cisneros JM, et al. Valganciclovir as treatment for cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 20-7.
  14. Benmarzouk-Hidalgo OJ, Cordero E, Martín-Peña A, García-Prado E, Gentil MA, Gómez-Bravo MA, et al. Prevention of cytomegalovirus (CMV) disease using pre-emptive treatment after solid organ transplant in patients at high risk for CMV infection. *Antivir Ther* 2009; 14 (5): 641-7.
  15. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1094-97.
  16. Moins-Teisserenc H, Busson M, Scieux C, Bajzik V, Cayuela JM, Clave E, et al. Patterns of Cytomegalovirus reactivation are associated with distinct evolutive profiles of immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *JID* 2008; 198: 818-26.
  17. Gerna D, Lilleri D, Fornara C, Comolli G, Lozza L, Campana C, et al. Monitoring of human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity in patients receiving solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 2356-64.
  18. Lilleri D, Gerna D, Fornara C, Lozza L, Maccario R, Locatelli F. Prospective simultaneous quantification of human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell reconstitution in young recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Blood* 2006; 108: 1406-12.
  19. Pourghesari B, Piper KP, McLammon A, Arrazi J, Bruton R, Clark F, et al. Early reconstitution of effector memory CD4+ CMV-specific T cells protects against CMV reactivation following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2008; 1-9.

## CÉLULAS MESENQUIMALES Y TRASPLANTE HEMATOPOYÉTICO

M.C. DEL CAÑIZO, S. CARRANCIO,  
F.M. SÁNCHEZ-GUIJO, M. DÍEZ CAMPELO,  
J.A. PÉREZ SIMÓN

*Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca. Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC (Universidad de Salamanca-CSIC). Centro en Red de Medicina Regenerativa y Terapia Celular de Castilla y León (SACYL-ISCIH)*

### Introducción

El trasplante hematopoyético es un procedimiento terapéutico cuyo objetivo final es sustituir una hematopoyesis enferma por una sana en pacientes afectados por diferentes hemopatías –malignas o no–, así como algunas enfermedades congénitas. Por razones evidentes, durante muchos años se han estudiado las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), su forma de ob-

tención, anidación, el número requerido para su uso etc. Sin embargo, se está dando cada vez más importancia a los mecanismos implicados en el anidamiento y regulación de las CPH y, por lo tanto, al micromedioambiente medular implicado en estos procesos.

En 1968, Friedenstein *et al.* demostraron la existencia en MO de unas células con capacidad clonogénica, de aspecto fibroblástico a las que denominaron *CFU-F*. En el momento actual, estas células se denominan *células madre mesenquimales* (MSC) y son las células progenitoras del estroma medular. El micromedioambiente hematopoyético constituye un complejo órgano en el que las células del estroma ejercen su función reguladora local, facilitando contactos celulares adecuados y sintetizando moléculas que contribuyen al mantenimiento celular, así como a la producción del número conveniente de precursores comprometidos para el adecuado desarrollo de la hematopoyesis. La población de células que forman el estroma hematopoyético es heterogénea, con gran diversidad de tipos celulares implicados en la regulación de la hematopoyesis, pero proceden de un progenitor común: las MSC<sup>1-3</sup>.

El estudio de las MSC ha permitido poner en evidencia su capacidad de diferenciarse hacia distintos tejidos –su multipotencialidad–, así como la capacidad inmunomoduladora, lo que hace de ellas una fuente celular muy atractiva en modelos de medicina regenerativa y trastornos inmunitarios<sup>4,5</sup>.

Estos antecedentes indujeron a diversos grupos de investigadores a analizar el papel que estas células pudieran tener en el trasplante alogénico en dos contextos diferentes: mejorar el injerto hematopoyético (IH) y tratar la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH).

### Las MSC y su papel en el injerto de los progenitores hematopoyéticos

#### Estudios preclínicos

La primera cuestión que se plantea al hablar de MSC en el contexto del trasplante alogénico es la de si estas células son capaces de injertar en la MO del receptor. Los datos existentes son contradictorios. Mientras que la mayoría de los estudios consideran que, tras el trasplante alogénico, las células del estroma no injertan y la mayoría son del receptor<sup>6</sup>, otros grupos<sup>7,8</sup> –entre los que se encuentra el nuestro– han comprobado que en algunas ocasiones un pequeño porcentaje de las MSC son del donante. El hallazgo en común es que se trata de pacientes con enfermedades en las cuales se encuentra el estroma dañado, de tal manera que, probablemente, en ausencia de un “defecto” en las CSM es difícil de demostrar su injerto tras el trasplante<sup>6</sup>. Recientemente se ha desarrollado un modelo

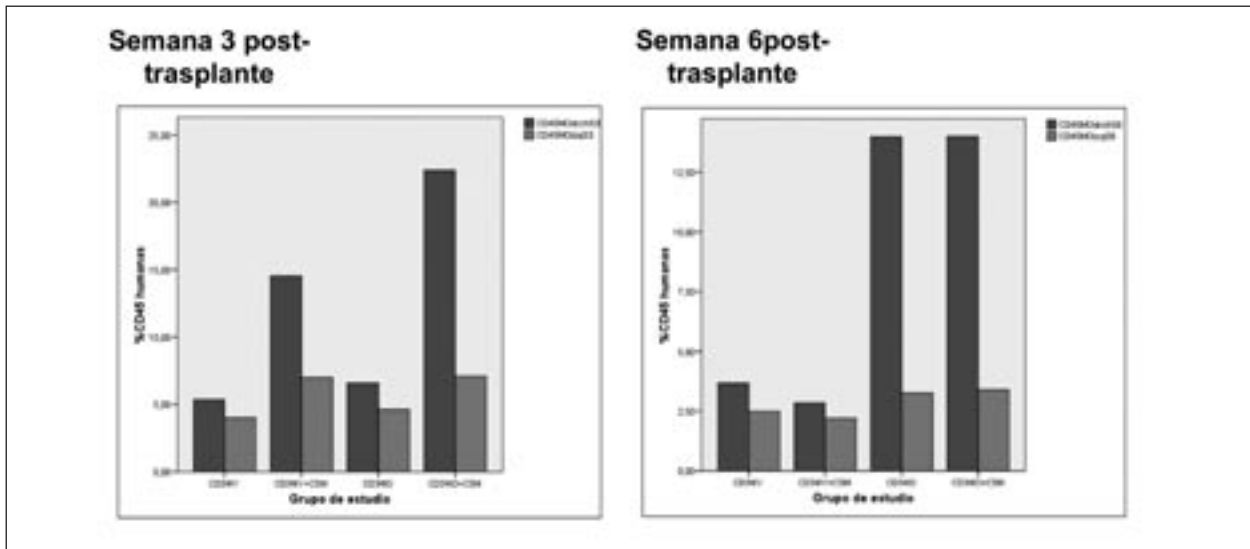


Figura 1. Quimerismo de CPH humanas en modelo murino. IV: inyección intravenosa; IO: inyección intraósea. CSM: células mesenquimales.

animal en el que se reproduce la hematopoyesis humana al inyectar MSC expandidas *in vitro* tras su inyección intraósea<sup>9</sup>. Utilizando este modelo animal e inyectando progenitores hematopoyéticos junto con la inyección intraósea de MSC humanas hemos comprobado que éstas aceleran el injerto y mejoran el quimerismo humano (Figura 1)<sup>10</sup> y en este contexto se pueden encontrar MSC humanas en el hueso en que se ha realizado la inyección. Una de las hipótesis que

se plantean en la actualidad es que las CSM podrían actuar, en el contexto del trasplante hematopoyético, mejorando el funcionalismo de un micromedioambiente dañado por la radioquimioterapia. Nosotros, en un modelo desarrollado *in vitro* de daño del micro-medioambiente por la acción del VP 16 hemos comprobado que la adición de MSC sanas al lecho dañado mejora la capacidad de mantenimiento de la hematopoyesis (Figura 2)<sup>10</sup>.

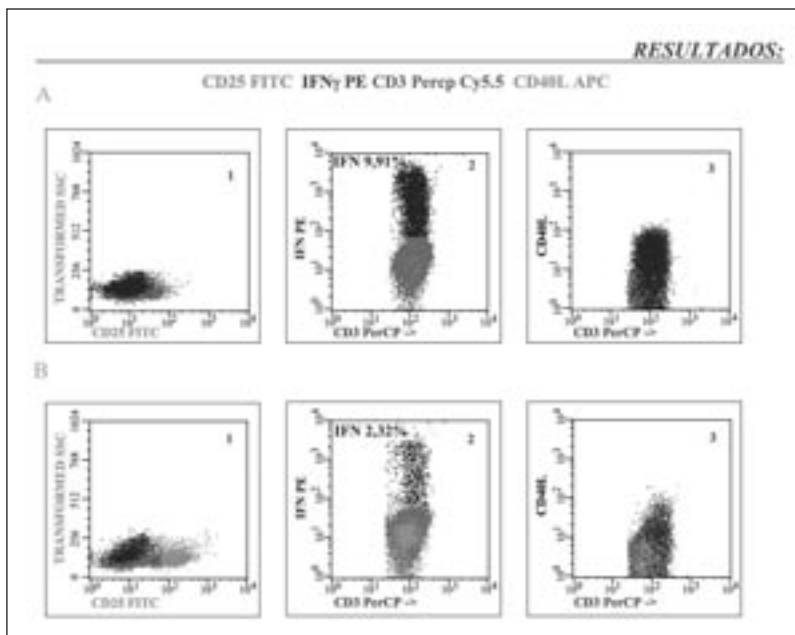


Figura 2. Acción de las CSM sobre los linfocitos T. A) En ausencia de MSC. B) En presencia de MSC.

### Estudios clínicos

Basados en estos hallazgos algunos autores han iniciado ya ensayos con el fin de mejorar el injerto. Los primeros en realizarlo fueron Frassoni *et al.*, quienes infundieron MSC junto a las CPH y comprobaron que efectivamente éstas eran capaces de acelerar el injerto y que, además, disminuía la incidencia de EICH<sup>11</sup>. Más recientemente<sup>12</sup>, en un ensayo piloto, se han utilizado MSC de donantes en pacientes sometidos a trasplante alogénico que presentaban un injerto pobre. En algunos pacientes se observó una recuperación de las cifras. Asimismo, se ha comprobado que estas células pueden ser útiles en el tratamiento de la aplasia pura de células rojas secundaria a incompatibilidad mayor ABO<sup>13</sup>.

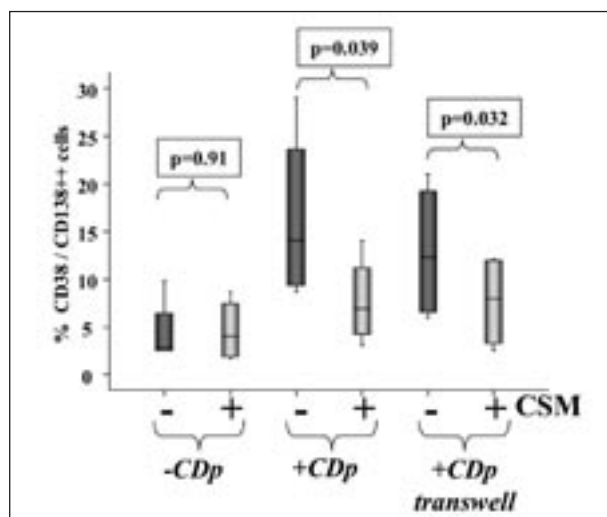


Figura 3. Efecto de las CSM sobre diferenciación de células B hacia células plasmáticas.

### Las MSC y su papel inmunoregulator en el trasplante de progenitores hematopoyéticos

Una de las características que hacen a las células mesenquimales candidatas ideales en programas de terapia celular es su baja alogenicidad y su capacidad inmunomoduladora. Hacer una revisión exhaustiva de las múltiples acciones inmunomoduladoras que ejercen estas células está fuera del propósito de este trabajo, por lo que nos limitaremos a resaltar lo que consideramos más relevante.

#### Estudios preclínicos

Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que las MSC son capaces de inhibir la respuesta alógena de los linfocitos T estimulados en cultivo mixto o que inhiben la proliferación linfocitaria inducida por mitógenos<sup>14</sup>.

En nuestra experiencia, las CSM bloquean el ciclo celular de linfocitos estimulados con PHA, anti-CD3 o anti-CD28, e independientemente del estímulo las CSM reducen la expresión de IFN- $\gamma$  intracitoplasmático en los linfocitos T (Figura 2). Cuando analizamos las vías de señalización implicadas comprobamos que las CSM inhiben la fosforilación tanto de la vía de Akt como de la vía de Erk 1/2.

En contraste con la amplia información relativa al efecto de las CSM sobre los linfocitos T, son pocos los estudios que se han centrado en evaluar el efecto de las CSM sobre los linfocitos B y, aunque los datos en ocasiones son discordantes, cada vez es más evidente el efecto pleiotrópico de estas células<sup>15,16</sup>.

En nuestra experiencia<sup>17</sup>, las CSM incrementan la viabilidad de los linfocitos B de forma significativa, tanto en situación de reposo (cultivo con Ig+CpG) como de proliferación (cultivo con Ig+CpG+CD40L+IL-4) e incrementan el número de células B en fase G0/G1; es decir, las CSM mantienen la viabilidad y bloquean la proliferación de los linfocitos B (Figura 3). Analizamos su efecto sobre la diferenciación B y comprobamos que en presencia de células dendríticas plasmocitoides se incrementa el número de células positivas para los marcadores CD38/CD138; pero, cuando se añaden CSM, se produce una disminución significativa en el porcentaje de estas células, es decir, las CSM bloquean la diferenciación de los linfocitos B hacia células plasmáticas.

#### Ensayos clínicos

El efecto inmunomodulador de las CSM ha motivado su utilización en el tratamiento de la EICH. Desde la publicación inicial de Le Blanc *et al.*<sup>18</sup> en la que se describe cómo la infusión de CSM haploidénticas permite rescatar a un paciente con EICHa severa, la experiencia clínica utilizando este procedimiento se ha ampliado notablemente. Así, estos mismos investigadores publicaron posteriormente un ensayo clínico llevado a cabo en Europa<sup>19</sup>. Estos pacientes presentaban EICHa refractaria. La dosis media de CSM infundida fue de  $1,4 \times 10^6$  (rango:  $0,4-9 \times 10^6$ ) / kg. La respuesta global fue de 71%; 30 pacientes alcanzaron RC y 9 mejoría de su EICH. La mediana de tiempo entre la infusión y la respuesta fue de 18 días (rango: 3-63). Curiosamente el grado de identidad HLA entre paciente y donante de CSM no se relacionó con el grado de respuesta.

Recientemente, en un ensayo con menor número de pacientes se obtienen también un número de respuestas significativo, aunque los resultados no son tan impresionantes como los previamente descritos<sup>20</sup>.

Por otra parte, dado el efecto inmunosupresor de las CSM, no está claro si su infusión puede tener un efecto adverso sobre el control de la enfermedad de base, incrementando el riesgo de recaída<sup>21</sup>.

Uno de los problemas de los ensayos clínicos descritos es el uso de suero bovino fetal en el medio de cultivo. Para evitar este inconveniente, en colaboración con la Clínica Universitaria de Navarra hemos llevado a cabo un estudio en el que se compara la capacidad de expansión de las CSM y los efectos inmunomoduladores de las mismas empleando suero bovino fetal frente a suero humano<sup>22</sup>. Hemos podido comprobar que, tanto el lisado plaquetario como el suero humano constituyen alternativas válidas al suero bovino fetal para la expansión de las CSM y sin el riesgo de transmisión de zoonosis.

En base a los hallazgos de este estudio estamos realizando un ensayo clínico de tratamiento de EICH refractario con CSM expandidas con suero autólogo +/- lisado plaquetario (código CSM/EICH2005). El procedimiento ha sido seguro, sin efectos secundarios relacionados con la infusión aunque algún paciente ha desarrollado procesos infecciosos intercurrentes.

## Conclusiones

Las CSM pueden ejercer un efecto múltiple en el trasplante hematopoyético: por un lado, pueden favorecer el injerto y, por otro, pueden ejercer un efecto inmunomodulador que tendría una aplicación evidente para prevenir o tratar la enfermedad del injerto contra el huésped. Sin embargo, los datos existentes en el momento actual son aún preliminares por lo que su utilización en el trasplante hematopoyético, en cualquiera de sus aplicaciones, debe continuarse haciendo en el contexto de ensayos clínicos controlados.

## Agradecimientos

*Algunos resultados indicados en el presente trabajo han sido posibles en parte como consecuencia de los siguientes proyectos de investigación: GRS/222/A/08 (Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León), PEI 052 180 (Instituto de Salud Carlos III)*

*S.C. es una investigadora predoctoral financiada con una beca de formación de personal investigador de la Junta de Castilla y León.*

## Bibliografía

- Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001; 226: 507-20.
- Dominici M, Hofmann TJ, Horwitz EM. Bone marrow mesenchymal cells: biological properties and clinical applications. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001; 15: 28-37.
- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000; 28: 875-84.
- Dominici M, Hofmann TJ, Horwitz EM. Bone marrow mesenchymal cells: biological properties and clinical applications. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001; 15:28-37.
- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000; 28: 875-84.
- Bacigalupo A. Mesenchymal stem cells and haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Hematol* 2004; 17: 387-99.
- Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Med* 1999; 5: 309-13.
- Villaron EM, Almeida J, López-Holgado N, et al. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2004; 89: 1421-7.
- Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, et al. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood* 2006; 107: 1878-87.
- Carrancio S, Sanchez-Guijo FM, López-Holgado N, et al. Human mesenchymal stem cells can ameliorate hematopoietic function after chemo-radiotherapy induced stromal damage. 14<sup>th</sup> Congress EHA, Berlin 2009.
- Frassoni F, Labopin M, Bacigalupo A, et al. Expanded mesenchymal stem cells co-infused with HLA identical hematopoietic stem cell transplants reduce acute and chronic graft versus host disease: a matched pair analysis. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29: S2.
- Meuleman N, Tondreau T, Ahmad I, et al. Infusion of mesenchymal stromal cells can aid hematopoietic recovery following allogeneic hematopoietic stem cell myeloablative transplant: a pilot study. *Stem Cells Develop* 2009 (prepublished online).
- Fang B, Song Y, Li N, Li J, Han Q, Zhao RC. Mesenchymal stem cells for the treatment of refractory pure red cell aplasia after major ABO-incompatible hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2009; 88: 261-6.
- Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105: 1815-22.
- Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005; 105: 2821-7.
- Krampera M, Cosmi L, Angeli R, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24: 386-98.
- Tabera S, Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, et al. The effect of Mesenchymal Stem Cells on the viability, proliferation and differentiation of B lymphocytes. *Hematologica* 2008; 93: 1301-9.
- Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 36 (3): 1439-41.
- Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for the treatment of steroid resistant, severe, acute graft versus host disease: a phase II study. *Lancet* 2008; 371: 1579-89.
- von Bonin M, Stölzel F, Goedecke A, Richter K, Wuschek N, Hölig K, et al. Treatment of refractory acute GVHD with third party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant* 2009; 43 (3): 245-51.
- Ning H, Yang F, Jiang M, et al. The correlation between co-transplantation of MSC and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical trial. *Leukemia* 2008; 22: 593-9.
- Pérez-Illarbe M, Díez-Campelo M, Aranda P, et al. Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. *Transfusion* (en prensa).