



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

**CINÉTICA Y FACTORES PREDICTIVOS DE
LA RECONSTITUCIÓN INMUNE EN EL
TRASPLANTE DE SANGRE DE CORDÓN
UMBILICAL**

NEREA CASTILLO FLORES

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Facultat de Medicina

Director: Dr. Sergi Querol Giner

Tutor: Josep M^a Ribera Santasusana

Bellaterra, Marzo del 2017

SERGIO QUEROL GINER, Facultativo especialista en Hematología y Hemoterapia del Banc de Sang i Teixits, i **JOSEP MARIA RIBERA SANTASUSANA**, Facultativo especialista de Hematología y Hemoterapia del Hospital Germans Trias i Pujol

CERTIFICAN: Que la licenciada **NEREA CASTILLO FLORES** ha llevado a cabo con nuestra dirección en el Banc de Sang i Teixits, el trabajo con el título: *Cinética y Factores Predictivos de la Reconstitución Inmune en el Trasplante de Sangre de Cordón Umbilical*, que presenta en esta memoria, la cual constituye su Tesis Doctoral para optar al grado de Doctora en Medicina.

Y para que se tome en conocimiento y tenga los efectos que corresponda, presentamos ante el Departament de Medicina y l'Escola de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona la mencionada Tesis firmando con esta certificación en

Bellaterra, Marzo de 2017

Sergio Querol Giner

Josep Maria Ribera Santasusana

We are all in the same boat

(Dr. Raj Sisodia, originario de la India, Profesor en Política de Comercio)

AGRADECIMIENTOS

Para mi han sido muy importantes tanto las personas que han contribuido a elaborar los trabajos que componen esta tesis como las que me han acompañado durante todo este periodo. A todos ellos, gracias de verdad.

En primer lugar quisiera dar las gracias a mi director y tutor de tesis. Gracias por vuestros conocimientos, por vuestro apoyo, por vuestra comprensión y por vuestra paciencia. Gracias por abrirme la mente, por la ilusión y por alentarme especialmente en los momentos difíciles. Siempre sois inspiración.

Quisiera dar las gracias a todas las personas que han contribuido a mi formación como hematóloga desde que empecé la residencia hasta la fecha. Gracias por estar en el día a día más cotidiano porque esos momentos son los que han hecho de mi la profesional y persona que soy ahora.

Reservo un apartado para David Valcárcel y Pere Barba. Gracias por acompañarme en los primeros pasos en el mundo del trasplante y por compartir ciencia. Gracias por animarme a evolucionar y por vuestro espíritu inquieto. Sabéis que os admiro.

Gracias a mis padres y a mi hermana, ya que para mi han sido de vital importancia. Son los que han estado a mi lado siempre para apoyarme permitiendo así que llegara a ser la persona que soy ahora. Gracias por no cuestionarme nunca, por dejarme elegir y por darme las herramientas para poder aprender, crecer y hacerme más fuerte.

Quiero recordar a mis amistades, pilares principales de mi vida. Gracias a Esther y a su gran familia, por estar siempre ahí desde hace muchos años, a golpe de llamada, cuando sea y para lo que sea. Espero tenerte siempre.

Gracias a Amparo, por su alegría, por su fortaleza, por rescatarme en el peor de los momentos, por hacerme ver las cosas diferente y por animarme siempre. Te quiero mucho.

Gracias a Marta por ser tan buena amiga, por compartir, por cuidarme, por sus consejos, por empujarme a hacer cosas nuevas, por hacerme la vida mejor y por hacerme entender lo importante que es la amistad.

No puedo acabar sin dar las gracias a Idaira, una de las personas más importantes en mi vida. Gracias por sin saberlo, inundar mi espacio con tu alegría, por tu risa, por tu sonrisa y por ser una brisa de aire fresco siempre. En definitiva, gracias por ser como eres y por hacerme inmensamente feliz. Ya no me imagino la vida sin ti.

TABLA DE CONTENIDOS

Glosario de abreviaturas.....	
17	
Motivación de la tesis.....	
21	
Antecedentes y ámbito de estudio.....	
25	
Introducción.....	
29	
Generalidades del TSCU	31
Características de la SCU	33
Reseña histórica y bases científicas del TSCU	38
Realización del primer TSCU	40
Análisis de resultados post-TSCU	41
Hasta el año 2004: primeras experiencias y curva de mejora	41
Después del año 2004: identificación de los factores pronósticos	43
Estudios comparativos entre fuentes de PH	46
Situación actual y retos	50
Facilitación del injerto	50
Compatibilidad entre donante y receptor: EICR e EICT	57
Reconstitución inmune post-TSCU	61
Mecanismos de reconstitución linfocitaria T tras el TSCU	63
Valor y factores pronósticos de la reconstitución tímica tras el TSCU	66
Estrategias de mejora de la reconstitución inmune tras el TSCU	70
Justificación del estudio.....	
73	
Hipótesis de estudio y objetivos de la tesis.....	
77	

Resultados.....	
81	
Objetivo 1: Estudio de los factores pronósticos de la reconstitución inmune temprana y su impacto en los resultados del TSCU en pacientes con neoplasias hematológicas y enfermedades no neoplásicas	84
Resumen	84
Justificación	85
Material y métodos	85
Resultados	90
Objetivo 2: Estudio cinético de la reconstitución de las diferentes subpoblaciones linfocitarias y los factores asociados a su recuperación tras el TSCU en pacientes con neoplasias hematológicas y enfermedades no neoplásicas	116
Resumen	116
Justificación	117
Material y métodos	117
Resultados	122
Discusión.....	
145	
Sobre el primer trabajo	145
Sobre el segundo trabajo	149
Próximos pasos	153
Conclusiones.....	
155	
Bibliografía.....	
156	

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

μL	= Microlitro
ADN	= Ácido Desoxirribonucleico
AIR	= Acondicionamiento de Intensidad Reducida
Alo-TPH	= Trasplante Alogénico de Progenitores Hematopoyéticos
AMA	= Acondicionamiento Mieloablativo
BST	= Banc de Sang i Teixits
CAL	= Contaje Absoluto de Linfocitos
CAN	= Contaje Absoluto de Neutrófilos
cCETs	= Células Epiteliales del Córtex Tímico
CCL25	= <i>Chemokine (C-C motif) ligand 25</i>
CD	= Células Dendríticas
CIBMTR	= <i>Center for International Blood and Marrow Transplant Research</i>
CMH	= Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CMV	= Citomegalovirus
CNT	= Células Nucleadas Totales
COLBT	= <i>Cord Blood Transplantation</i>
CPA	= Célula Presentadora de Antígenos
CsA	= Ciclosporina A
CXCL12	= <i>C-X-C motif chemokine 12</i>
CXCR4	= <i>C-X-C chemokine Receptor type 4</i>
DCT	= Depleción de Células T
DE	= Donante Emparentado
DNE	= Donante No Emparentado
DPP4	= Dipeptidilpeptidasa 4
dTSCU	= doble Trasplante de Sangre de Cordón Umbilical
EBMT	= <i>European Bone Marrow Transplantation</i>
EICR	= Enfermedad Injerto Contra Receptor
EICRa	= Enfermedad Injerto Contra Receptor aguda
EICRc	= Enfermedad Injerto Contra Receptor crónica
EICT	= Efecto Injerto Contra Tumor
ETR	= Emigrantes Tímicos Recientes
FEC-G	= Factor Estimulante de Colonias-Granulocitos

FLT3-L	= <i>FMS Like Tيروسinkinasa 3-Ligando</i>
FPH	= Factor de Progenitores Hematopoyéticos
GAT	= Globulina Anti-Timocítica
Gy	= <i>Gray</i>
IA	= Incidencia Acumulada
IC	= Intervalo de Confianza
ICT	= Irradiación Corporal Total
IFN	= Interferón
IL	= Interleuquina
IO	= Infección Oportunista
ISHAGE	= <i>International Society of Hematotherapy and Graft Engineering</i>
IUSM	= <i>Indiana University School of Medicine</i>
JSHCT	= <i>Japanese Society of Hematopoietic Cell Transplantation</i>
LLA	= Leucemia Linfoblástica Aguda
LMA	= Leucemia Mieloblástica Aguda
LMC	= Leucemia Mieloide Crónica
mCETs	= Células Epiteliales de la médula Tímica
MFM	= Micofenolato de Mofetilo
MO	= Médula Ósea
MRT	= Mortalidad Relacionada con el Trasplante
NCBP	= <i>National Cord Blood Program</i>
NK	= <i>Natural Killer</i>
NLE-SCID	= <i>NLE-Severe Combined Immunodeficiency</i>
OR	= <i>Odds Ratio</i>
PDN	= Prednisona
PG	= Prostaglandina
PH	= Progenitores Hematopoyéticos
PML	= Progenitores Linfo-Mieloides
QT	= Quimioterapia
RC	= Remisión Completa
RCP	= Reacción en Cadena de la Polimerasa
RCT	= Receptor de Células (= linfocitos) T

RI	= Reconstitución Inmune
RIC	= Rango Intercuartílico
RT	= Radioterapia
SCU	= Sangre de Cordón Umbilical
SDF-1	= <i>Stromal Derived Factor 1</i>
SG	= Supervivencia Global
SLE	= Supervivencia Libre de Enfermedad
SMD	= Síndrome Mielodisplásico
SP	= Sangre Periférica
TASP	= Trasplante Autólogo de Sangre Periférica
TEPA	= <i>Tetraethylenepentamine</i>
Th	= <i>T helper</i>
TMO	= Trasplante de Médula Ósea
TNF	= <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TPO	= Trombopoyetina
TREC	= <i>T Restriction Excision Circles</i>
Treg	= T reguladores
TSCU	= Trasplante de Sangre de Cordón Umbilical
UFB-E	= Unidades Formadoras Burst-Eritroides
UFC	= Unidades Formadoras de Colonias
UFC-GEMM	= Unidades Formadoras de Colonias Granulocito/Eritroide/ Macrófago/ Megacariocítica
UFC-GM	= Unidades Formadoras de Colonias Granulocito-Macrófago
VCAM1	= <i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
vs	= Versus

MOTIVACIÓN DE LA TESIS

En otras carreras científicas que no sean la de Medicina, parece que lo normal y lógico es realizar la tesis doctoral inmediatamente seguido a concluir una licenciatura. A pesar de esto, en mi carrera este camino no está tan claramente trazado ya que el estatus de “médico especialista” ya te otorga una categoría diferente a la de licenciado. Así que el esfuerzo adicional de realizar una tesis doctoral podría parecer absurdo y carecer de sentido. Sin embargo, personalmente, el desarrollo de esta tesis ha sido una decisión deliberada, una elección más que premeditada y con objetivos muy marcados. Aunque hay más motivos de los que expongo a continuación, los principales son los siguientes:

El primero de todos es aprender y desarrollarme académicamente en el campo de la investigación. Siendo fiel a mí misma, en cierto momento fui consciente que no había tenido la oportunidad de explorar el campo de la investigación, hecho que es absolutamente imprescindible. Así que pensé que la tesis doctoral sería una buena herramienta para suplir esta carencia.

El segundo motivo es culminar académicamente toda la etapa de aprendizaje desde el inicio de la especialidad de Medicina hasta el día de hoy. Para mí significa concluir un ciclo con esperanza de iniciar otro que me permita seguir aprendiendo, mejorar y evolucionar.

El tercer objetivo es algo sentimental y es dar las gracias a todas las personas que me han ayudado a ser quien soy hoy en día, muy especialmente a mis padres, de los cuales siempre he tenido todo el apoyo.

El tema de esta Tesis Doctoral se centra en el Trasplante de Sangre de Cordón Umbilical. Prácticamente desde el inicio de mi residencia, en cuanto pude tener contacto con el paciente hematológico, sentí un gran interés por el trasplante de progenitores hematopoyéticos. Lo cierto es que, para aquel entonces, el programa de trasplante de progenitores hematopoyéticos en pacientes adultos no estaba muy desarrollado en el Hospital Vall d' Hebrón, pero eso empezó a cambiar al final de mi residencia, teniendo la oportunidad de conocer a David Valcárcel, quien se convirtió en el director de la Unidad de Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos del servicio de Hematología de adultos. Debido

a la inquietud científica de David Valcárcel, quien había estado en contacto durante años con Sergi Querol, y a la necesidad de conocer los resultados del trasplante de sangre de cordón umbilical en Catalunya se planteó el inicio del estudio. Esta tesis ha permitido conocer con exactitud cuál es nuestra propia experiencia y dar paso a plantear nuevas estrategias para el tratamiento principalmente de hemopatías malignas.

ANTECEDENTES Y ÁMBITO DE ESTUDIO

La sangre de cordón umbilical (SCU) es utilizada como fuente alternativa de progenitores hematopoyéticos (PH) para realizar trasplantes alogénicos (Alo-TPHs) con el fin curativo de pacientes con hemopatías malignas y enfermedades no malignas. El efecto terapéutico en estos pacientes se obtiene mediante la quimioterapia (QT) y/o radioterapia (RT) del régimen de acondicionamiento que se administra antes de la infusión de los PH mediante el conocido efecto injerto contra tumor (EICT) mediado por las células del sistema inmune del receptor que derivan de los PH del donante.

Para proceder a la realización de un Alo-TPH es imprescindible identificar un donante de PH que sea compatible con el receptor. Si bien en el contexto familiar es posible encontrar hermanos compatibles, no todos los pacientes disponen de éste y en más del 50% se realiza a partir de donantes no emparentados (DNE). El elevado polimorfismo del sistema del complejo mayor de compatibilidad (CMH) requiere de la creación de grandes registros tanto de donantes voluntarios como de unidades de SCU. La SCU tiene la ventaja de permitir la realización de Alo-TPHs con menor grado de compatibilidad del CMH entre donante y receptor en un tiempo de identificación más corto. De esta manera, el uso de la SCU para realizar Alo-TPHs supone el poder disponer de un donante en aquellos casos donde el paciente no disponga de un hermano o DNE compatible en un tiempo óptimo para la realización de éste. La instauración de esta modalidad de trasplante tiene como objetivo extender el uso del Alo-TPH en general y concretamente en las minorías étnicas.

Aunque la eficacia global del trasplante de SCU (TSCU) en cuanto a supervivencia ha sido comparable a la obtenida por otras modalidades de Alo-TPH realizados a partir de otras fuentes de PH ya sea de médula ósea (MO) o sangre periférica (SP), la reconstitución inmune (RI) post-TSCU parece ser más tardía que en el resto. Este hecho pone en un elevado riesgo de infecciones oportunistas (IO) a los pacientes que reciben un TSCU y en consecuencia se objetiva una elevada morbi-mortalidad post-TSCU.

A pesar que existen algunos trabajos previos que han estudiado la RI tras el TSCU, se sabe poco en cuanto a los factores predictivos de ésta. Además

cabe decir que no se han realizado estudios describiendo detalladamente este evento en nuestro ámbito. En este estudio, el hecho que la mayoría de pacientes reciban un acondicionamiento similar, permite describir la cinética de la recuperación de las principales poblaciones linfocitarias post-TSCU y abordar sus factores predictivos. La presente Tesis Doctoral por tanto, describe los resultados obtenidos en cuanto a cinética y factores predictivos de la RI tras el TSCU en pacientes pediátricos y adultos con enfermedades hematológicas y no hematológicas.

La RI es un evento que ha sido estudiado ampliamente tras el Alo-TPH. En la presente Tesis Doctoral me referiré a la RI como a la reconstitución de la población de linfocitos en números absolutos y de cada una de las subpoblaciones linfocitarias principales de manera cuantitativa. Pese a que hay estudios donde previamente ya se ha descrito la cinética de la RI tras las diferentes modalidades de TSCU (utilizando 1 ó 2 unidades de SCU o diferentes intensidades en el régimen de acondicionamiento), los factores predictivos de ésta no se han estudiado en profundidad, hecho que justifica los trabajos de la presente Tesis Doctoral.

Algunos trabajos previos han descrito la implicación de algunos factores pre-TSCU sobre la RI tanto en modelos de TSCU que emplean depleción de células T (DCT) en el acondicionamiento como los que no la emplean, demostrando una RI más precoz en pacientes que no reciben dicha DCT. En los trabajos que conforman esta tesis se ha podido estudiar el valor predictivo de la administración de dosis de globulina antitimocítica (GAT) y la cinética de la recuperación linfocitaria en estos casos. En resumen, los estudios que conforman esta tesis han demostrado el impacto que posee utilizar una determinada dosis de GAT observándose una RI más precoz, menor mortalidad y mayor supervivencia en pacientes que reciben una dosis menor de este fármaco en el régimen de acondicionamiento.

INTRODUCCIÓN

Generalidades del TSCU

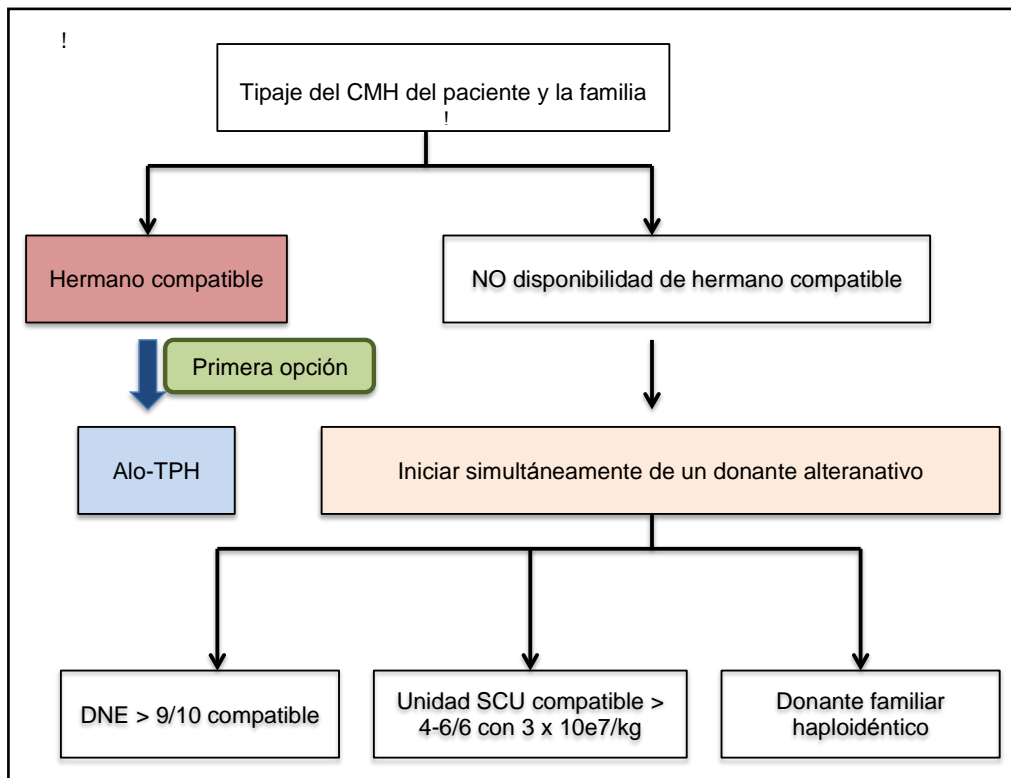
El Alo-TPH es una terapia curativa para enfermedades hematológicas y no hematológicas. Sin embargo el uso y el éxito de éste, están limitados por varios factores principalmente relacionados con la compatibilidad genética entre donante y receptor. Mientras que en la mayoría de los casos, los mejores resultados se obtienen tras Alo-TPH a partir de donante emparentado (DE) con compatibilidad idéntica del CMH, más de dos tercios de los pacientes que son candidatos a Alo-TPH carecen de un DE adecuado. Los Alo-TPH de DNE se asocian con mayor frecuencia a enfermedad injerto contra receptor (EICR) grave o fallo de implante y aunque el uso de DCT ha reducido sustancialmente el riesgo de EICR, esto último no ha dado lugar a una mejora de la supervivencia.

A pesar del desarrollo de un gran registro internacional de donantes voluntarios de PH, todavía hay un porcentaje de las búsquedas de DNE donde no se encuentra un donante adecuado en un tiempo óptimo. A partir del año 2000 la SCU incrementó su uso para realizar Alo-TPH de manera considerable y existen una gran cantidad de estudios que demuestran que ésta es una fuente alternativa de PH aceptable (*Rocha V, 2000; Rocha V, 2001; Rocha V, 2004; Eapen M, 2007; Eapen M, 2010*).

Fue a principios del 2000 cuando se publicaron los resultados iniciales de las primeras series de pacientes receptores de TSCU sugiriendo que no había grandes diferencias en términos de supervivencia libre de enfermedad (SLE) respecto al trasplante de médula ósea (TMO) de DNE, sin embargo, la MRT era muy elevada debido a diversos factores. El TSCU presenta la gran ventaja de poder disponer de una unidad de SCU adecuada para proceder al Alo-TPH con una probabilidad mayor en comparación a otras fuentes de PH. Por esta razón, se han realizado estudios comparativos entre los Alo-TPHs a partir de las diferentes fuentes de PH. Estos estudios permiten ubicar a la SCU dentro del algoritmo de selección de un donante alternativo en el caso de no disponer de un DE con compatibilidad del CMH. En la Figura 1 se muestra el algoritmo a seguir para la selección de un donante de PH (*Grewal S, 2003*). Dichos

estudios son de carácter retrospectivo y se han llevado a cabo en población pediátrica y adulta afecta por leucemia aguda. Los resultados de estos estudios podemos dividirlos según el momento de publicación; iniciales (antes del año 2004) y actuales (después del año 2004).

Figura 1. Algoritmo de selección de donante de PH



Tomado de Grewal SS et al. *Blood*. 2003;101:4233-44.

Características de la SCU

La SCU es un tejido humano que tras el parto suele desecharse y corresponde a la sangre fetal que queda en la placenta y el cordón umbilical tras haberse realizado la ligadura tras el alumbramiento. Los estudios realizados con sangre fetal durante el periodo de gestación dieron lugar a plantearse el uso de la SCU como fuente de PH para el Alo-TPH. Durante la gestación existe un proceso de continua movilización de PH ya que los núcleos principales de la hemopoyesis van cambiando de lugar en el feto hasta el nacimiento facilitando la repoblación de los diferentes nichos hematopoyéticos (*Shields LE, 1995*). Hacia las 10 semanas de edad, alrededor del 5% de las células mononucleadas expresan el antígeno CD34+, el cual ha sido utilizado para definir poblaciones celulares con capacidad de injerto. Estas células mononucleadas son capaces de dar lugar a PH de todos los linajes hematopoyéticos cuando son sembradas en cultivos clonogénicos, mostrando una gran capacidad para producir una elevada cantidad de células cuando se expanden *ex vivo*; unidades formadoras de colonias [(UFC)-Granulocito/Eritroide/Macrófago/Megacariocíticas (GEMM), UFC-GEMM], Unidades Formadoras Burst-Eritroides (BFU-E) y Granulocito-Macrófago (UFC-GM) (*Campagnoli C, 2000*). Aunque la proporción de células CD34+ en relación con las células mononucleadas disminuye a lo largo de la gestación, su concentración por unidad de volumen se mantiene, siendo su capacidad clonogénica similar. Tras el nacimiento se inicia una disminución brusca del porcentaje de células CD34+ circulantes (*Gonzalez S, 2009*). A las 24 horas del nacimiento esta disminución puede representar el 70% de las células CD34+ circulantes de sangre fetal y a la semana del nacimiento el número es similar al de la sangre adulta (*Broxmeyer HE, 1992*). El volumen de la SCU obtenida en el momento del nacimiento tras la ligadura es de aproximadamente 80 mL. Los valores promedio de su contenido son: un hematocrito de 49%, hemoglobina de 15.5 g/dL, leucocitos de $16.1 \times 10^9/L$ y aproximadamente el 0.3% de las células nucleadas son CD34+. Además, puede existir una contaminación de la SCU por células maternas debido a la comunicación materno-fetal que ocurre durante el parto, pudiéndose identificar ácido dexósirribonucleico (ADN) materno en las unidades de SCU (*Poli F J,*

1997). Los resultados obtenidos del estudio de la SCU (confirmación de la presencia de diferentes tipos de PH en la SCU, crecimiento de PH de todos los linajes hematopoyéticos tras la siembra de células mononucleadas en cultivos clonogénicos y objetivación de la capacidad de expansión *ex vivo* con incremento considerable en número) (Broxmeyer HE, 1989; Broxmeyer HE, 2009) impulsaron a diferentes investigadores a considerar la SCU como un tejido potencialmente apto para el Alo-TPH.

A pesar que el número de células nucleadas disponibles para realizar un TSCU es limitado comparado con un Alo-TPH de MO o de SP, Broxmeyer et al. (Broxmeyer HE, 1989) realizaron el análisis de un gran número de muestras de SCU, concluyendo que la frecuencia de PH testados por UFC en la SCU es mayor que en MO, obteniendo un número adecuado de UFC-GM, UFB-E y UFC-GEMM. Pese a la limitación de volumen de SCU que puede ser recogido y al número inferior de PH de ésta, se demostró una reconstitución hematológica adecuada. En el momento en el que se inició el uso de la SCU para Alo-TPH la criopreservación de las unidades de SCU y su posterior descongelación para realizar el TSCU requería que no se realizara ningún tipo de separación celular por tal de mantener un número adecuado de PH evitando una pérdida importante de éstos. Los primeros TSCU se realizaron con las unidades de SCU criopreservadas por Broxmeyer HE y aunque se sabía que el número de PH era bajo, se pensaba que la capacidad proliferativa sería adecuada debido a la gran capacidad de expansión *ex vivo* de los PH, ya que eran capaces de regenerar la MO tratada previamente con dosis letales de RT en modelos murinos (Broxmeyer HE, 1989; Broxmeyer HE, 1991).

Estudios posteriores demostraron la existencia de PH circulantes en SP tanto en modelos murinos como en adultos sanos. A través del estudio realizado por Knudtzon S et al. (Knudtzon S, 1974), se comparó la concentración *in vitro* de las UFC de la SCU con la concentración de éstas en SP. Para el estudio, las células de cada una de las fuentes fueron sembradas de la manera habitual (Robinson WA, 1971) en el medio de cultivo. Los resultados mostraron un aumento considerable en la concentración de UFC en la SCU en comparación

con las de SP. Este estudio concluyó que la SCU podía ser utilizada como fuente de PH para restaurar la función hematopoyética en los pacientes.

La sangre de MO recogida contiene PH capaces de restablecer la hemopoyesis en un receptor tras la administración del acondicionamiento. Estudios posteriores demostraron que en modelos murinos, perros o monos, la reconstitución de la hemopoyesis se podía lograr mediante transfusión de células de SP únicamente. La evidencia indirecta del cultivo *in vitro* de PH mieloides circulantes sugiere que los PH pluripotenciales circulan de manera normal en la especie humana. En el estudio realizado por Mc Carthy et al. (*Mc Carthy DM, 1984*) se observó que el número de PH en SP de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) se encontraba aumentado, así que estas células pueden ser recolectadas, criopreservadas y utilizadas posteriormente como "autoinjertos de MO".

De acuerdo con esta idea, otros autores (*Kessinger A, 1986*) estudiaron por primera vez el utilizar células mononucleadas de SP en pacientes diagnosticados de carcinoma de mama metastásico con infiltración de MO y que habían fracasado a la terapia convencional con QT a dosis altas e irradiación corporal total (ICT). Las células mononucleadas de SP autólogas criopreservadas (mediana de dosis de $6.3-8.4 \times 10^8/\text{kg}$) obtenidas por leucaféresis antes de la terapia a dosis alta se infundieron por vía intravenosa. Posteriormente, se observó el injerto en MO y la reaparición de todas las líneas celulares en SP, observando que la reconstitución hematopoyética en humanos puede lograrse con transfusiones de células mononucleadas de SP autóloga tras una terapia a dosis alta.

El propósito del estudio realizado por Broxmeyer et al. (*Bromeyer HE, 1989*) fue evaluar la SCU como una alternativa a la MO para el Alo-TPH. A pesar que en aquel momento no se disponía de un test cuantitativo directo para los PH, se emplearon las UFC-GM como indicador válido de la capacidad de injerto. Se examinaron más de 100 muestras de SCU por su contenido en células nucleadas totales (CNT), UFC-GM, BFU-E y UFC-GEMM, antes y después de la criopreservación. El hallazgo a destacar de este estudio fue que el número

de PH se encontraba dentro del rango estimado para asegurar el injerto. De este estudio se concluyó que la SCU de un donante era una fuente de PH suficiente para proporcionar la reconstitución hematopoyética alógena.

Como se ha comentado previamente la SCU como fuente alternativa de PH, demostró su capacidad de injerto y por lo tanto su capacidad para reconstituir la MO. Se demostró que el número de PH de las unidades de SCU se encontraba en el rango asociado con buenos resultados tras el Alo-TPH. La SCU tiene el potencial necesario para superar algunas de las limitaciones que presenta la obtención de PH de MO de aquel entonces.

El hecho que el TSCU requiera una menor identidad del CMH facilitó el desarrollo de bancos para almacenar unidades de SCU con el fin de complementar los incipientes registros de donantes voluntarios. En esta situación, estaban justificados los estudios sistemáticos de viabilidad de la SCU para la reconstitución de MO de pacientes a gran escala. El trabajo publicado por Rubinstein et al. (*Rubinstein P, 1993*) evaluó la eficacia y características a tener en cuenta en el panel de la SCU como entidad propia para realizar Alo-TPHs. Los primeros TSCU se realizaron a partir de DE con CMH-idéntico. Desde que se realizó el primer TSCU en 1988 se dio paso a la implantación de manera muy rápida de este procedimiento en niños, por lo que se crearon bancos de SCU, aumentando la disponibilidad de ésta como fuente alternativa de PH. En 1996 se publicaron los resultados del primer TSCU de DNE en adultos, demostrando que este procedimiento es factible en pacientes de peso más elevado (*Laporte JP, 1996; Kutzberg J, 1996*).

Independientemente que se utilice 1 ó 2 unidades de SCU para la realización del TSCU, la selección de la unidad de SCU se realiza principalmente en base a la dosis de CNT/kg de peso del receptor, de la compatibilidad del CMH-A, -B a nivel antigénico y -DR alélico, del banco de origen y de la disponibilidad del segmento contiguo a la bolsa de SCU.

El TSCU que se realiza con una única unidad de SCU se considera la estrategia estándar por muchos centros con resultados en cuanto a

supervivencia tanto en niños como en adultos comparables al Alo-TPH de un DNE (Eapen M, 2007; Eapen M, 2010). Los resultados de un estudio realizado previamente en 1061 pacientes receptores de un TSCU con 1 única unidad de SCU con acondicionamiento mieloablativos (AMA) para el tratamiento de enfermedades hematológicas, mostró como compensar la dosis de CNT según la compatibilidad del CMH (Barker JN, 2010). El estudio mostró mejores resultados en receptores de unidades de SCU con compatibilidad 6/6 independientemente de la dosis de CNT (mediana $4 \times 10^7/\text{kg}$). Sin embargo, los receptores de una unidad de SCU con compatibilidad 4/6 requirieron una dosis celular mayor (mediana $\geq 5 \times 10^7/\text{kg}$) para igualar la MRT y la SLE de los receptores de unidades de SCU con compatibilidad 5/6 con una dosis mediana de CNT de $\geq 2.5 \times 10^7/\text{kg}$. Estos hallazgos introducen el concepto de “escala”, según el cual una mayor disparidad en la compatibilidad del CMH entre donante y receptor requeriría una dosis mayor de CNT para obtener mejor supervivencia. Cabe destacar que el impacto de la compatibilidad del CMH junto con la dosis de CNT se ve influenciado por el uso de los acondicionamientos basados en fludarabina o el uso de 2 unidades de SCU.

Pese a que estos datos confirman que la SCU es una fuente de PH adecuada para Alo-TPH si las unidades reúnen ciertas características, en los casos de los TSCU donde se utiliza una única unidad de SCU, es poco probable encontrar una de éstas que contenga una dosis elevada de CNT, sobre todo para pacientes adultos. Esto pone de manifiesto que tanto la recuperación hematológica como la RI van a ocurrir con una cinética y unas tasas de éxito algo menor que en el TMO o el Alo-TPH de SP. La mejora de estos aspectos, mediante la manipulación *ex vivo* para la expansión de PH, el uso de una tercera fuente de PH para la obtención de injertos transitorios que reduzcan el tiempo de neutropenia o el uso de dos unidades de SCU para la realización de un doble TSCU (dTSCU), parecen opciones factibles para superar estas limitaciones.

Reseña histórica y bases científicas del TSCU

El uso de la SCU como fuente de PH apta para Alo-TPH fue sugerido por Broxmeyer, Boyse y Bard en 1982. Boyse creyó que la SCU se podía usar como hemoderivado para transfusión. Sin embargo, Broxmeyer pensó que podía ser utilizada para realizar Alo-TPHs. A raíz de esto, se creó la Biocyte Corporation. Tras varias reuniones donde se discutieron los conceptos, posibilidades y consideraciones éticas para la realización de TSCUs, la Biocyte Corporation financió a Broxmeyer en la Indiana University School of Medicine (IUSM) durante 2 años para estudiar la biología y criopreservación de las células de SCU. La SCU se obtuvo inicialmente por Gordon Douglas en la IUSM y posteriormente en la New York University Medical Center. Puesto que los estudios realizados previamente confirmaron que la SCU es apta para realizar TSCU, se procedió a realizar el primer TSCU en 1988 (*Gluckman E, 1989; Broxmeyer HE, 1989; Wagner JE, 1992; Kohli-Kumar M, 1993*). Los trabajos clínicos y científicos derivados de esta experiencia fueron publicados en 1989, momento óptimo para asegurar los resultados del TSCU.

La SCU posee una elevada capacidad proliferativa y parece contener una cifra aceptable en el número de PH contenidos en una única bolsa de SCU. Sin embargo, Broxmeyer descubrió que había una pérdida inaceptable de células de la SCU cuando las células mononucleadas eran separadas. Además, debido a la necesidad de criopreservar las unidades de SCU para que pudieran ser enviadas desde New York a Indiana, se observó que había una cantidad mayor de PH post-descongelación que previo a la criopreservación (*Broxmeyer HE, 1989*).

Las unidades de SCU pueden permanecer criopreservadas durante más de 20 años manteniendo una recuperación eficiente de los PH en cuanto a número, funcionalidad y en la capacidad de injerto tras el descongelado, mostrando ser superior que los de MO tras los estudios realizados en modelos murinos (*Broxmeyer HE, 1989*).

Se decidió realizar el primer TSCU en un niño afecto por anemia de Fanconi, ya que disponía de un hermano no afecto y con CMH compatible. Dicho TSCU fue realizado en París por Eliane Gluckman. La unidad de SCU fue infundida tras acondicionar al paciente sin separación o lavado de las células de SCU para asegurar una menor pérdida de PH. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la reducción de volumen de las unidades de SCU era un procedimiento aceptable previo a la criopreservación.

Realización del primer TSCU

Como se ha mencionado previamente, el primer TSCU se realizó en octubre de 1988 en un niño con anemia de Fanconi gracias a la colaboración entre Auerbach (Rockefeller University, New York), Broxmeyer (IUSM) y Gluckman (Hospital Sant Loius, Paris). La SCU fue recogida por el Dr. Douglas siendo la donante una hermana con compatibilidad CMH idéntica no afecta por anemia de Fanconi y la unidad de SCU se criopreservó en el IUSM. Previo al TSCU, la French National Ethics Committee dio su autorización para su realización siendo considerado un tratamiento obligatorio y urgente. Nunca antes se había realizado un TSCU en humanos, aunque los PH de MO criopreservados ya habían demostrado efectividad y seguridad previamente. En consecuencia, la SCU que se había considerado un producto de desecho hasta entonces, empezó a ser considerada un producto terapéutico regulado en muchos países.

El receptor fue acondicionado con un esquema nuevo ideado para pacientes con anemia de Fanconi, basado en bajas dosis de ciclofosfamida (20 mg/kg en vez de 200 mg/kg) y 5 Gy de irradiación total linfóide. Las células de la unidad de SCU fueron entregadas en mano en París desde Indiana en un *dry shipper* manteniendo la temperatura a -175 °C. Los PH de SCU fueron descongelados en el día de la infusión sin realizarse ningún tipo de manipulación. Las alícuotas de las células criopreservadas fueron usadas para evaluar la cantidad de PH y su viabilidad antes de ser enviadas al centro trasplantador y también después de descongelar, siendo las cifras muy similares. Los primeros signos de injerto se observaron en el día +22 post-TSCU objetivándose una reconstitución hematológica y un quimerismo completo de la donante. No se observaron signos ni síntomas de EICR y tras más de 25 años el paciente no ha presentado complicaciones tardías, manteniendo una reconstitución hematológica e inmunológica completa de la donante a día de hoy.

Análisis de resultados post-TSCU

Hasta el año 2004: primeras experiencias y curva de mejora

En el año 2004 se publicaron los resultados de los primeros TSCUs, los cuales sirvieron para estandarizar el procedimiento de esta modalidad de Alo-TPH. Perteneciente a este periodo, se publicaron 2 grandes estudios en pacientes adultos que compararon los resultados del TSCU y TMO según los datos que provenían del CIBMTR/NCBP (*Laughlin MJ, 2004*) y del EBMT/Netcord (*Rocha V, 2004*), respectivamente. El estudio de Laughlin et al. incluyó pacientes adultos con leucemia aguda que recibieron un TSCU con 1 diferencia (N = 34) ó 2 diferencias del CMH (N = 116) y un TMO sin diferencias (N = 367) ó con 1 diferencia en el CMH (N = 83). Cabe destacar que los pacientes receptores de un TSCU eran más jóvenes que el resto, tenían una leucemia aguda en una fase más avanzada y recibieron una dosis menor de CNT. En cuanto al injerto mieloide precoz, observaron diferencias significativas en la incidencia acumulada de injerto de neutrófilos y plaquetas siendo más tardía en el caso de los TSCU (27 y 60 días respectivamente) y en TMO con 1 diferencia del CMH (20 y 29 días respectivamente) que en TMO con CMH idéntico (18 y 29 días respectivamente). A pesar de las diferencias halladas en el periodo precoz post-TSCU, no se observaron diferencias más allá del día +100.

La EICRa ocurrió con mayor probabilidad tras el TMO con 1 diferencia del CMH y la EICRc fue mas frecuente en los receptores de TSCU. Los pacientes que recibieron un TMO con 1 diferencia del CMH y un TSCU con alguna diferencia del CMH presentaron tasas de MRT, recaída y supervivencia similares, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Por lo tanto, este estudio demostró que las unidades de SCU con alguna incompatibilidad del CMH también deben ser consideradas para TSCU en pacientes adultos cuando no se dispone de un donante de PH.

En el año 2004 también se publicó un trabajo (*Rocha V, 2004*) que comparó los resultados en 682 pacientes adultos con leucemia aguda, donde 98 de ellos recibieron un TSCU y 98 un TMO de DNE. Los trasplantes se realizaron entre

1998 y 2002 y los resultados fueron reportados a Eurocord y al grupo *EBMT*. Los receptores de un TSCU eran más jóvenes que los receptores de un TMO (mediana de edad, 24.5 vs. 32 años; $P < 0.001$) y se encontraban en una fase más avanzada de la enfermedad. Los receptores de un TMO no presentaban diferencias en la compatibilidad del CMH y el 94% de las unidades de SCU sí presentaban alguna diferencia en la compatibilidad del CMH. La mediana de las CNT infundidas fue de $0.23 \times 10^8/\text{kg}$ para los receptores de un TSCU y $2.9 \times 10^8/\text{kg}$ para los receptores de TMO. El estudio objetivó diferencias estadísticamente significativas en la incidencia acumulada del injerto de neutrófilos a +60 días siendo del 75% post-TSCU y del 89% post-TMO. El fallo de implante ocurrió en un 20% en TSCU y del 7% en TMO. El análisis multivariado demostró diferencias significativas en la recuperación de neutrófilos siendo más retrasada en los TSCU (riesgo relativo, 0.49; IC95% 0.41-0.58; $P < 0.001$). El estudio demostró un menor riesgo de EICRa grado II, III y IV tras el TSCU (riesgo relativo, 0.57; IC95%, 0.37-0.87; $P = 0.01$). Sin embargo, no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de EICRc, MRT, tasas de recaída y SLE. En definitiva, la conclusión principal de este estudio fue similar al anterior, siendo que la SCU de un DNE es una fuente de PH alternativa cuando no hay disponibilidad de un donante voluntario adulto.

Después del año 2004: identificación de factores pronóstico

Como se ha mostrado en el anterior apartado, los trabajos publicados hasta el año 2004 fueron trabajos que mostraban los resultados globales de las primeras series de receptores de TSCU y sirvieron para establecer el procedimiento de una manera estandarizada con la ganancia de experiencia. Sin embargo, a partir del 2004, además de la publicación de los resultados globales post-TSCU, los trabajos en este periodo analizaron los factores de riesgo pre-TSCU que podían influir sobre los resultados de los pacientes sometidos a este procedimiento.

El estudio publicado por Brunstein et al. (*Brunstein CG, 2010*), analizó la efectividad del dTSCU. El porqué del uso de 2 unidades de SCU se basó en trabajos previos (*Rocha V, 2009*) donde se había demostrado que la dosis celular de la unidad de SCU tenía impacto sobre los resultados. De este modo, el uso de 2 unidades de SCU tuvo como objetivo alcanzar un determinado valor de dosis celular por tal de mejorar los resultados del TSCU. El estudio de Brunstein et al. comparó esta modalidad de TSCU con el resto de modalidades. Dicho estudio incluyó receptores de un Alo-TPH (MO y SP) de DE con CMH idéntico 8/8 (N = 204), DNE con CMH idéntico 8/8 [N = 152, (64 TMO y 88 alo-TPH SP)], DNE con compatibilidad 7/8 del CMH [N = 52, (18 TMO y 34 alo-TPH SP)] y dTSCU con AMA con compatibilidad 4/6 del CMH (N = 128). El injerto de neutrófilos a los +45 días y plaquetas a los +100 días post-TSCU fue 7 y 30 días más retrasado respectivamente que en el resto de grupos. En este estudio la dosis celular de CNT infundida fue inferior en el grupo de TSCU y probablemente influyó en los tiempos de injerto, ya que del total de las 256 unidades de SCU, sólo 29 de ellas contenían $\geq 3 \times 10^7/\text{kg}$. La incidencia acumulada de EICRa grado II-IV fue menor tras el TSCU y en el análisis multivariado el factor predictor protector fue tener un DNE con CMH idéntico o con una diferencia en el CMH. La incidencia acumulada de EICRc fue menor en los TSCU que en el resto de grupos. La incidencia de MRT a 2 años fue más elevada en el grupo de TSCU hallándose como factor de riesgo de ésta el injerto mieloide retrasado. En este mismo estudio, la incidencia de recaída a 5

años fue comparable en todos los grupos, aunque fue menor en el caso de los TSCU. La incidencia de recaída fue la causa más frecuente de muerte en los Alo-TPH de DE, Alo-TPH de DNE con CMH idéntico y Alo-TPH de DNE con 1 diferencia del CMH. En este estudio, no hubo diferencias en la probabilidad de supervivencia global (SG) entre grupos.

A pesar que este estudio concluyó que el dTSCU es una modalidad de Alo-TPH aceptable cuando es necesario un TSCU con una única unidad de SCU que no alcanza un mínimo de CNT de $\geq 3 \times 10^7/\text{kg}$, el injerto mieloide tras el dTSCU fue más retrasado que en el resto de modalidades de Alo-TPH incluidas en el estudio, siendo éste el principal factor de riesgo de la MRT.

En el año 2011 se publicó el primer estudio que analizó el impacto de la dosis celular y la compatibilidad del CMH por alta resolución sobre el injerto mieloide tras un dTSCU (Avery S, 2011). El estudio incluyó a 84 pacientes receptores de un dTSCU con AMA. La tasa de injerto de neutrófilos fue del 94% y se hallaron factores predictivos con impacto sobre el injerto mieloide como la dosis de linfocitos T CD3+ infundida ($P = 0.04$) y la viabilidad de las CD34+ ($P = 0.008$). En dicho estudio, se demostró que la dosis de CNT, CD34+ y UFC de la unidad de SCU dominante estaban asociadas a un injerto sostenido de neutrófilos más rápido ($P = 0.07$, $P = 0.0008$ y $P < 0.0001$, respectivamente). Este estudio también demostró que la dosis de CNT ($P = 0.0007$) y de linfocitos T CD3+ infundidos ($P = 0.001$) fueron factores predictivos de injerto. La disparidad del CMH por alta resolución entre donante y receptor se objetivó en una alta frecuencia, pero no demostró influencia sobre el injerto ($P = 0.66$). La incompatibilidad del CMH entre los pares de unidades de SCU tampoco demostró tener influencia sobre el injerto. Pese a que la disparidad del CMH entre unidades de SCU no afectó al injerto, los receptores de unidades con una mejor compatibilidad (7-10/10), demostraron un injerto más precoz ($P < 0.0001$).

El objetivo del estudio retrospectivo publicado recientemente (Baron F, 2016) fue comparar los resultados del trasplante en pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) que recibieron un TSCU después de un acondicionamiento de intensidad reducida (AIR) o AMA. En este estudio se incluyeron 894 adultos

con LMA que recibieron un TSCU con una única unidad de SCU o un dTSCU entre 2004 a 2013 en los centros del grupo *EBMT*. Cuatrocientos quince pacientes recibieron AIR mientras que 479 pacientes recibieron AMA. En comparación con los receptores de un AMA, los receptores de un AIR tuvieron una incidencia similar de injerto de neutrófilos, EICRa y EICRc. Sin embargo, los receptores de un AIR tuvieron una mayor incidencia de recaída y una menor MRT, traducándose en una SLE y SG comparable, lo que resultó en una supervivencia similar en ambas modalidades.

Estudios comparativos entre fuentes de PH

Los primeros estudios comparativos basados la mayoría de veces en estudios casos-control pareados, pudieron demostrar las diferencias que existen entre diferentes fuentes de PH en cuanto a resultados clínicos. Así, evidenciaron que la recuperación hematológica fue más lenta y la probabilidad de injerto fue menor en pacientes receptores de un TSCU que un TMO. El TSCU se asocia a un injerto de neutrófilos y plaquetas post-trasplante retrasado y a una mayor incidencia de fallo de implante comparado con otras fuentes de PH. Las posibles causas de estos hechos podrían deberse a diferentes factores. Uno de ellos sería debido a las características cuantitativas de la unidad de SCU, ya que ésta contiene de 1 a 2 logaritmos menos del número de PH. Otros factores que pueden explicar este fenómeno sería la gran disparidad en la compatibilidad del CMH entre donante y receptor o la mala RI de los linfocitos T, hecho que conduce a una alta incidencia de IO sobre todo en el periodo precoz post-TSCU. Además, cabe destacar que una probabilidad de injerto baja se encuentra asociada a una elevada incidencia de mortalidad.

En 2007, fue publicado un estudio comparando los resultados de un estudio retrospectivo en niños que recibieron un TSCU o un TMO de DNE con la información reportada al CIBMTR y al NCBP (*Eapen M, 2007*). El estudio comparó los resultados entre 4 grupos de pacientes: TMO con compatibilidad del CMH idéntica (116 pacientes), TMO con una diferencia del CMH, TSCU sin diferencias del CMH (compatibilidad 6/6, 35 pacientes) y TSCU con 1 ó 2 diferencias del CMH (compatibilidad 5/6 y 4/6, 201 y 267 pacientes respectivamente). Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que los TSCU eran trasplantes sin identidad del CMH en la mayoría de los casos, algo que prácticamente no sucedía en los TMO. El número de CNT infundidas en el caso de los TSCU fue significativamente menor que en los TMO que no recibieron DCT, pero no mucho menor que en los TMO con DCT. La mediana de tiempo de injerto de neutrófilos y plaquetas fue de 19 días (rango 9-33 días) y 27 días (rango 12-285 días) respectivamente tras el TMO y 25 días (rango 9-90) y 59 días (rango 12-237) respectivamente tras el TSCU. La incidencia

acumulada de injerto de neutrófilos a +42 días post-trasplante fue más retrasada en el caso de los TSCU con alguna diferencia del CMH, pero no en los TSCU con compatibilidad del CMH 6/6. La incidencia acumulada del injerto de plaquetas a los +6 meses tras el Alo-TPH fue inferior en los TSCU con alguna diferencia del CMH que en el resto de pacientes.

En los últimos años, múltiples estudios han reportado una baja incidencia de EICR tras el TSCU sobre todo si tenemos en cuenta la alta disparidad en la compatibilidad del CMH entre donante y receptor. La incidencia de EICR ocurrió sobre todo a expensas de EICRa grado II-IV y EICRc cuando se comparó con Alo-TPH de MO o de SP. La incidencia y las características de la EICR tras el TSCU dependió de algunos factores como el uso de 1 ó 2 unidades de SCU, del uso o no de GAT pre-trasplante y del grado de compatibilidad del CMH.

La incidencia de EICRa grado II-IV y III-IV fue similar entre los grupos de receptores de un TMO (con o sin diferencias del CMH) y los receptores de TSCU con o sin diferencias del CMH. La incidencia de EICRc no demostró diferencias entre grupos.

En el estudio de Eapen et al. (*Eapen M, 2007*) donde las unidades de SCU se infundieron según la dosis celular (alta o baja), la MRT fue similar entre grupos a excepción de los TSCU con 2 diferencias en el CMH, que fue superior independientemente de la dosis de CNT. El 80% de las muertes ocurrieron en los 3 primeros meses post-trasplante. La recaída fue similar en todos los grupos a excepción de los TSCU con compatibilidad 4/6 que presentaron una tasa de recaída menor que el resto de grupos. La SLE a +5 años post Alo-TPH fue del 60% en el grupo de TSCU con compatibilidad 6/6, del 36% y 46% en TSCU 5/6 según alta o baja dosis de CNT infundida, respectivamente. La SLE en el caso de los receptores de TMO con compatibilidad del CMH idéntico y TMO con 1 diferencia del CMH fue del 38% y 37% respectivamente.

El estudio comparativo realizado por el CIBMTR/EBMT (*Eapen M, 2010*) incluyó grupos de pacientes parecidos a otros estudios (*Brunstein CG, 2010*)

aunque a diferencia de éste, en el estudio de Eapen et al. todos los pacientes recibieron un Alo-TPH de DNE. En este estudio se compararon los resultados entre 332 TMO de DNE con compatibilidad del CMH 8/8, 140 TMO de DNE con compatibilidad del CMH 7/8, 632 Alo-TPH de SP con compatibilidad del CMH 8/8, 256 Alo-TPH de SP con compatibilidad del CMH 7/8 y 165 TSCU (N= 10 TSCU 6/6, N= 40 TSCU 5/6 y N= 115 TSCU 4/6). Existieron diferencias significativas en el tiempo de injerto mieloide entre las diferentes fuentes de PH siendo más rápido en los Alo-TPH de SP que en el TMO y en éste más rápido que en el TSCU, siendo las medianas de injerto de neutrófilos y plaquetas de 14 días (rango 5-28 días) y 19 días (rango 7-112 días) respectivamente, 19 días (rango 6-41 días) y 28 días (rango 10-150 días) respectivamente y de 24 días (rango 12-68 días) y 52 días (rango 22-275 días), respectivamente. Globalmente la mediana de CNT infundida en estos pacientes adultos fue de 2.6 ($1-6.1 \times 10^7/\text{kg}$) y los pacientes que recibieron un TSCU con una única unidad de SCU contenían una mediana de CNT de 2.5 ($1-6 \times 10^7/\text{kg}$).

Como ya se ha comentado previamente, en este estudio se compararon 5 grupos de pacientes (receptores de un Alo-TPH de SP, receptores de un TMO con compatibilidad del CMH 7/8 y 8/8 respectivamente y receptores de un TSCU). La incidencia acumulada de EICRa grado II-IV y de EICRc fueron significativamente menor en los TSCU e independientemente de la fuente de PH, la EICR tanto aguda como crónica fue menor en pacientes que recibieron GAT en el acondicionamiento.

Este estudio analizó los resultados tras Alo-TPH teniendo en cuenta el CMH por alta resolución y hay que destacar que los TSCU recibieron como mínimo una dosis de CNT de $2.5 \times 10^7/\text{kg}$. La MRT fue significativamente superior en los TSCU que en los Alo-TPH de SP 8/8 y TMO 8/8. Se objetivó que la mayoría de muertes tras el TSCU ocurrieron durante los primeros 6 meses. Teniendo en cuenta la fuente de PH, la incidencia de recaída fue similar en todos los grupos, pero fue más elevada en los pacientes que no se encontraban en remisión de la enfermedad de base previo al trasplante. Los pacientes que presentaban EICRc mostraron una menor tasa de recaída independientemente de la fuente

PH utilizada. La SLE fue similar en los diferentes grupos independientemente de la fuente PH.

Situación actual y retos

Tras todo lo expuesto anteriormente, sabemos que uno de los factores fundamentales que contribuyen considerablemente al éxito del TSCU es la rapidez del injerto, hecho que depende principalmente de la dosis de CNT y CD34+ infundidas. Otro de los factores determinantes para el TSCU es el grado de compatibilidad del CMH entre donante y receptor. Este hecho tiene impacto sobre eventos como la EICR, la cual significa una de las causas principales de fracaso tras el Alo-TPH. Y por último, una adecuada RI post-TSCU es crucial para la prevención de IO, hecho que aporta una elevada morbi-mortalidad.

Por lo tanto, con el objetivo de asegurar los mejores resultados tras el TSCU, es de gran importancia el seleccionar unidades de SCU adecuadas para proceder al trasplante e implementar estrategias de mejora como las que se exponen a continuación.

Facilitación del Injerto

Tal y como se ha expuesto previamente, los resultados tras el TSCU en cuanto a SG son comparables al resto de fuentes de PH pero presenta una carencia en cuanto a la cinética de injerto, lo que le confiere un alto riesgo de morbilidad y mortalidad (*Mehta RS, 2017*). Las causas que pueden explicar estos hechos son la limitada dosis celular infundida y la relativa inmadurez de las células de la SCU. En el TSCU cabe destacar la no disponibilidad de linfocitos del donante para infundir posterior al trasplante por tal de reforzar la inmunidad derivada del donante para el tratamiento de infecciones, estados de quimerismo mixto o recaídas de la enfermedad de base. Es por ello que han sido propuestas algunas alternativas clínicas con el objetivo de aumentar el número de PH a infundir.

Entre estas estrategias, destacan la infusión de varias unidades de SCU parcialmente compatibles (*Sauter C, 2011; Jacobson CA; 2012; van Heist JW,*

2013), la infusión intraósea de la SCU (Frassoni, 2008; Rocha V, 2013), el uso de células CD34+ seleccionadas de un donante auxiliar haploidéntico (Bautista G, 2009; Martín-Donaire T, 2009) o la infusión de células expandidas *ex vivo* (Tung SS, 2010; De Lima, 2008; Sphall E, 2002).

Infusión de 2 unidades de SCU (dTSCU)

En el TSCU la dosis de las CNT y/o CD34+ y la adecuada compatibilidad del CMH entre donante y receptor son factores determinantes para el injerto tanto en pacientes pediátricos como adultos. Los dTSCU se realizaron por primera vez por el grupo de Minneapolis en un intento de aumentar la dosis celular infundida en adultos y niños (Barker JN, 2005). Ambas unidades de SCU contribuyen al injerto temprano, aunque finalmente, predomina una de éstas. En un análisis de 23 dTSCU con AMA, se observó hematopoyesis de un único donante en el 76% de los pacientes en el día +21 y en el 100% de los pacientes en el día +100 (Barker JN, 2004). Del mismo modo, tras revisar 81 pacientes con quimerismo sostenido tras recibir un dTSCU utilizando un acondicionamiento no-mieloablativo, el quimerismo de la unidad de SCU dominante fue detectable en un 57, 81 y 100% de pacientes en los días +21, +100 y +365, respectivamente (Brunstein CG, 2007). Los dTSCU mostraron altos índices de injerto (85-100%), con una mediana de tiempo de injerto de neutrófilos que fue de 9 a 33 días dependiendo del régimen de acondicionamiento y/o el uso de factor estimulante de colonias de granulocitos (FEC-G) (Barker JN, 2004; Brunstein CG, 2007; Somers JA, 2013). A pesar que no se demostró una diferencia significativa en la tasa de injerto entre los pacientes que recibiendo 1 ó 2 unidades de SCU (Brunstein CG, 2007; Verneris MR, 2009), se objetivó un menor riesgo de recaída en los pacientes que recibieron un dTSCU para el tratamiento de la leucemia aguda en primera y segunda remisión completa (RC1/RC2), posiblemente a través de un aumento del EICT (Levac K, 2005). Ruggeri et al. publicaron los resultados de 35 dTSCU en pacientes con enfermedades hematológicas de alto riesgo (Ruggeri A, 2011). La incidencia acumulada de la recuperación de neutrófilos fue del 86%,

de la EICRa del 47% y de la primera infección viral del 92%. Cabe destacar que la RI se retrasó debido al conteo bajo de linfocitos T y linfocitos B a expensas de una expansión compensatoria de células NK observada hasta +9 meses tras el trasplante, seguido de la aparición de nuevos precursores tímicos.

Infusión de SCU junto con células CD34+ seleccionadas de un donante auxiliar haploidéntico (Haplocord)

El uso combinado de SCU y PH haploidénticos de un donante auxiliar se ha utilizado como estrategia para mejorar el injerto mieloide tras el TSCU (Fernandez MN, 2003; Sebrango A, 2010; Liu H, 2011). Mientras que el injerto de los PH haploidénticos proporciona un injerto temprano, es el injerto de la SCU el que normalmente proporciona el injerto a largo plazo. Diferentes autores han publicado los resultados de esta modalidad de trasplante en receptores afectados por hemopatías malignas y han observado incidencias acumuladas de injerto de neutrófilos y plaquetas del 96% y el 78% con un tiempo medio de recuperación de 10 y 32 días, respectivamente. En el trabajo publicado por Fernandez MN et al. la mayoría de pacientes consiguió alcanzar un quimerismo completo de la SCU [incidencia acumulada 91% [(intervalo de confianza (IC)95%, 84-99%)] con una mediana de tiempo de 57 días (rango, 11-186 días) y una incidencia acumulada a +100 días del 83%. La incidencia acumulada del injerto de neutrófilos fue del 95% en el día +50 con una mediana de tiempo de injerto de 11 días siendo la del injerto de plaquetas del 83% en el día +100 con una mediana de recuperación de 19 días. La incidencia acumulada de EICRa y EICRc fue del 25 y 5%, respectivamente, con una MRT al año del 38%, recaída del 30% y SG del 55%.

Facilitación del homing

Infusión intraósea de la SCU

En un estudio de Fase I/II realizado entre 2006 y 2008, 32 pacientes consecutivos con leucemia aguda recibieron un TSCU con infusión intraósea (Frassoni F, 2008). El estudio demostró que no se produjeron complicaciones durante la administración de la unidad de SCU. La mediana de tiempo para el injerto de neutrófilos y plaquetas fue de 23 días (rango, 14-44 días; n = 28) y 36 días (rango, 16-64 días; n = 27) respectivamente, y todos los pacientes que injertaron mostraron quimerismo completo del donante a partir del día +60 en adelante. Dieciséis pacientes se encontraban vivos y en RC con una mediana de seguimiento de 13 meses. En un estudio de Fase I Okada et al. demostraron que la infusión intraósea de SCU no lavada tras un régimen de AIR también fue bien tolerada y el tiempo medio para la recuperación de neutrófilos fue de 17 días (Okada M, 2011). Saglio et al. demostraron que la infusión intraósea también fue bien tolerada en niños (Saglio F, 2012). En un estudio retrospectivo de Eurocord donde se comparan los resultados del TSCU realizado con una única unidad de SCU (n = 87) y dTSCU con infusión intraósea (n = 149); esta última se asoció con un mejor injerto de neutrófilos en el día +30 (76 vs. 62%, $P = 0.014$) y día +180 (74 vs. 64%, $P = 0.003$). La infusión intraósea de SCU también se asoció con una menor incidencia de EICRa y mostró una tendencia a mejorar la SLE (Rocha V, 2003).

Los factores que promueven el *homing* de los PH de SCU al nicho en la MO también pueden mejorar el injerto. El factor 1 derivado del estroma [(o *Stromal Derived Factor*, (SDF-1) (CXCL12)] es producido por células estromales de la MO y se une a su receptor, el CXCR4, situado en la superficie de los PH, linfocitos pre-B y linfocitos T. Los niveles de SDF-1 aumentan tras el acondicionamiento y los PH infundidos siguen el gradiente SDF-1 hacia el nicho en la MO. Una vez que los PH han injertado, el SDF-1 también puede promover la proliferación y supervivencia de éstos (Broxmeyer HE, 2003; Bittencourt H, 2013). Muchos factores aumentan la sensibilidad de CXCR4 en los PH, incluyendo el complemento (C3a), ácido hialurónico, VCAM1,

fibrinógeno y trombina. La inhibición de la peptidasa extracelular unida a la membrana (CD26), que escinde el SDF-1, también puede mejorar el injerto de las células CD34+ de la SCU (Christopherson KW, 2007; Jimenez A, 2011).

Otras estrategias para facilitar el homing

Existen otras estrategias para mejorar el *homing* como la expansión *ex vivo* basada en aumentar la nutrición de las células del microambiente. La fucosilación es una estrategia potencial para lograr un injerto más rápido es mejorando el *homing* de los PH hacia la médula del receptor. La fucosilación de ligandos de selectina de los PH es un proceso crítico para lograr el contacto de éstos con selectinas P y E seleccionadas expresadas en la microvascularización del endotelio, que es el paso inicial para el *homing* en la MO. En modelos murinos los PH fucosilados son responsables del injerto y es conocido que los que provienen de MO y de SP tienen niveles más elevados de fucosilación. Un estudio de Fase I demostró obtener buenos resultados tras la infusión de PH de SCU fucosilados, objetivando una mediana de tiempo de injerto de neutrófilos y plaquetas de 14 y 33 días respectivamente (Oran B, Blood 2013). A partir de estos resultados no está claro los efectos de la fucosilación sobre la hematopoyesis y como será la RI a largo plazo. Cutler et al. utilizaron una estrategia alternativa basada en la incubación *ex vivo* con dimetil-PG E2 de una de las 2 unidades utilizadas para un dTSCU. La dimetil-PG E2 tiene efectos pleotrópicos en los PH sobrepresando genes implicados en el *homing*, proliferación y supervivencia (Curtler C, 2013). Todos estos estudios preclínicos mostraron buenos resultados, pero requieren investigación adicional

Expansión ex vivo de la SCU

Una de las estrategias para aumentar la dosis celular de las unidades de SCU por tal de mejorar el injerto mieloide tanto a corto como a largo plazo es la expansión *ex vivo*. La expansión de la unidad de SCU puede realizarse por diferentes métodos. El primero de ellos es el cultivo donde se aíslan células CD34+ o CD133+ en la presencia de citoquinas y factores de crecimiento seleccionados, como el factor de PH (FPH), trombopoyetina (TPO), FEC-G y/o FMS-like tyrosinkinasa 3-ligando (FLT-3-L) (Levac K, 2005; Sphall EJ, 2002). Algunos grupos también han añadido IL-3 y/o IL-6 al medio. Shpall et al. realizaron un estudio de viabilidad en el que se aislaron células CD34+ del 40-60% de la unidad de SCU y fue expandida en cultivo líquido con FPH, FEC-G, TPO y factor de crecimiento y diferenciación de megacariocitos (Sphall EJ, 2002). El resto de la unidad fue infundida con las células expandidas después del acondicionamiento. La mediana de CNT infundida fue de $0.99 \times 10^7/\text{kg}$ (rango, $0.28-8.50 \times 10^7/\text{kg}$) y el tiempo medio para el injerto fue 28 días (rango, 15-49 días) para neutrófilos y 106 días (rango, 38-345 días) para las plaquetas. Usando una modificación de esta estrategia, se realizó un ensayo de Fase I/II en el que las células CD133+ de la unidad de SCU se expandieron en cultivos con FPH, FLT-3-L, IL-6, TPO y el quelante de cobre TEPA (De Lima M, 2008). La mediana de expansión de CNT fue de 219 veces más de la cifra basal (rango, 2-260). A pesar que la mediana de las CNT infundidas no fue muy elevada ($1.8 \times 10^7/\text{kg}$), todos los pacientes incluidos en el estudio injertaron. La mediana de tiempo de injerto de neutrófilos y plaquetas fue de 30 días (rango, 16-46 días) y 48 días (rango, 35-105 días), respectivamente. Delaney et al. publicaron los resultados de un ensayo de Fase I utilizando el ligando Notch Delta-1 además de FPH, FLT-3-L, TPO, IL-3 e IL-6 (Delaney C, 2010). Diez pacientes con leucemia aguda de alto riesgo recibieron un dTSCU con AMA en el que una unidad se expandió utilizando este protocolo. La mediana de CNT fue de 562 veces más de cifra basal (rango, 146-1496) para las CNT y 164 (rango, 41-471) para las CD34+. Seis de los 10 pacientes injertaron neutrófilos con una mediana de tiempo de 16 días (rango, 7-34 días).

Otro método de expansión utiliza el co-cultivo acompañado de células mesenquimales para proporcionar un microambiente hematopoyético que aumente la proliferación de PH (Robinson S, 2005; Sotnezova EV, 2016). De Lima et al. publicaron los resultados de 31 pacientes que recibieron un dTSCU, donde una de las 2 unidades de SCU se expandió *ex vivo* con células madre mesenquimales. Este sistema de cultivo *ex vivo* expandió las CNT y CD34+ con una mediana de 12.2 y 30.1 veces de la basal, respectivamente. La dosis infundida de CNT fue de 8.34×10^7 /kg (De Lima M, 2012). De los 24 pacientes que recibieron células expandidas *ex vivo*, 23 lograron el injerto de neutrófilos con una mediana de tiempo de 15 días (rango, 9-42 días) y 18 mostraron un injerto sostenido de plaquetas con una mediana de tiempo de 42 días (rango, 15-62 días). Ambos compararon los resultados de manera favorable con 80 controles históricos del CIBMTR que recibieron TSCU no manipulados [injerto de neutrófilos de 24 días (rango, 12-52 días), $P < 0,001$; plaquetas 49 días (rango, 18-264 días), $P = 0.03$]. Aunque el TSCU expandido mejoró la recuperación hematopoyética temprana, en todos los casos, la unidad no manipulada proporcionó injerto a largo plazo.

La expansión de PH también se ha realizado utilizando un sistema de cultivo de perfusión continua donde las células se cultivan en un medio de cultivo fresco con intercambio gaseoso. En un estudio de Fase I, Jaroscak et al. expandieron una fracción de la unidad de SCU utilizando un dispositivo de cultivo de perfusión e infundieron estas células expandidas 12 días después del resto de la unidad original (Jaroscak J, 2001). La mediana de veces de aumento de las CNT fue de 2.4 (rango, 1.0-8.5). Veintiún de los 26 pacientes mostraron un injerto de neutrófilos con una mediana de tiempo de 22 días (rango, 13-40 días) y para el injerto de plaquetas de 71 días (rango, 39-139 días; n = 16).

A pesar del desarrollo de las estrategias anteriores, los resultados obtenidos no han mejorado la SG tras el TSCU.

Compatibilidad entre donante y receptor: EICR y EICT

Una de las características fundamentales de la SCU que la hace altamente disponible como fuente de PH para realizar Alo-TPHs es la posibilidad de usar unidades de SCU que no tengan una identidad completa del CMH con el receptor teniendo en cuenta 3 locus de manera estándar (CMH-A, CMH-B por baja resolución y CMH-DR por alta resolución) permitiendo un grado de disparidad en 2 de sus alelos como máximo. Pese a que el factor más importante para el desarrollo de EICR es la disparidad de los linfocitos T del donante reactivos contra los antígenos del receptor, el TSCU está caracterizado por una incidencia baja de EICRa y EICRc comparado con otras fuentes de PH. Los mecanismos de esta reducida incidencia de EICR tras el TSCU no son completamente conocidos, pero se sabe que los linfocitos T que son los responsables de producir la EICR tienen mayor tolerancia a la incompatibilidad del CMH y una alteración de la activación alogénica (*Barker JN, 2001; Canto E, 2003; Chen L, 2006*). La citotoxicidad de los linfocitos T CD8+ de la SCU es significativamente menor comparado con el resto de fuentes de PH, hecho que sugiere que el “defecto” de los linfocitos T CD8+ citotóxicos estaría relacionado con la baja incidencia de EICR (*Risdon G, 1994*). Estudios previos indican que los linfocitos inmunoreguladores tales como los linfocitos T reguladores (Treg), podrían ser de una gran importancia en el control del la EICR (*Trenado A, 2003*).

Otra de las principales razones que hace que la SCU sea menos alorreactiva que el resto de fuentes de PH es la presencia mayoritaria de células inmaduras tales como los linfocitos T *naïve* (CD45RA+) ya que el feto no está expuesto a patógenos o vacunas como los adultos. Por lo tanto, los linfocitos T de la SCU producen menos interferon- γ (IFN- γ) en comparación con el resto de fuentes de PH. Los linfocitos T CD4+ de la SCU interaccionan con las células presentadoras de antígenos (CPA) del receptor, hecho que lidera una activación de los linfocitos de la SCU y su diferenciación a linfocitos T helper (Th). En general la respuesta Th1 juega un papel crítico en la patogénesis de la EICRa y la respuesta Th2 reduce la EICR mediada por Th1. Una respuesta

inmune defectuosa es debida a la expresión alterada de la activación de factores de transcripción expresados en los linfocitos T CD4+. En el caso de la SCU, una deficiencia de producción de IFN- γ , una citoquina Th1, induce exacerbación de la EICRa.

Así como la respuesta de los linfocitos T está relacionada con el desarrollo de la EICRa, la función presentadora de antígenos de las células dendríticas (CD) del donante está involucrada en el desarrollo de la EICR (*Chakraverty R, 2007; Chunduri S, 2008*). En el caso de la SCU, se supone que la actividad de las CPA derivadas está inmunológicamente alterada debido a la inmadurez de éstas. Este hecho se validó tras observar que las CDs de la SCU son activadoras débiles de linfocitos T en comparación con PH de otras fuentes (*J Liu E, 2001; Chunduri S, 2008; Kollman, 2009*). En general, las CDs inmaduras sufren el proceso de maduración debido a la acción de diferentes factores de los patógenos como el lipopolisacárido, citoquinas proinflamatorias como el TNF, IL-1 β o el ligando CD40. Las CDs de la SCU presentan una limitación intrínseca en el proceso de maduración, por lo que no expresarían algunas moléculas (CMH-DR, CD40, CD86, CD83) y esto produce un retraso en la respuesta alorreactiva, hecho que podría explicar la baja incidencia de EICR grave tras el TSCU. Otro aspecto que contribuye a una baja incidencia de EICR grave tras el TSCU, es que las CD inmaduras actúan como supresoras inmunológicas induciendo tolerancia T específica pudiendo también inducir las propiedades reguladoras de los linfocitos T efectores y expansión de los linfocitos Treg.

Los linfocitos Treg son mediadores de la EICR, hecho que podría tener aplicabilidad clínica para su manejo, pero una de las principales limitaciones para su uso es la elevada dificultad para su aislamiento. La incidencia de EICR aumenta a medida que incrementa la disparidad del CMH entre donante y receptor cuando se realiza un Alo-TPH. Esto también sucede tras el TSCU, pero el grado de EICRa o EICRc para un mismo grado de disparidad es claramente menor en el TSCU que en el Alo-TPH a partir de otras fuentes de PH. Los trabajos publicados previamente han demostrado que la incidencia de

EICRa grado II-IV y EICRc en pacientes receptores de un TSCU es de alrededor del 30-50% y del 10-20%, respectivamente (*Rubinstein P, 1998; Rocha V, 2001*). En 2010 se llevó a cabo un estudio (*Rocha V, 2010*) donde se comparó la incidencia de EICR en niños receptores de TSCU frente a TMO de DE con CMH-idénticos. La incidencia acumulada de EICRa grado II-IV fue del 14% vs. 24%; $P = 0.02$ y EICRc de 5% vs. 14%, $P = 0.02$ en TSCU y TMO, respectivamente. Por lo tanto, en este estudio se objetivó una menor incidencia de EICR tras el TSCU siendo la gravedad de ésta menor, ya que ninguno de estos pacientes sufrió EICRa grado IV. Así que si tenemos en cuenta los criterios estándar de compatibilidad del CMH para seleccionar una unidad de SCU se permite un grado mayor de disparidad sin que este hecho suponga una mayor incidencia de EICRa ni EICRc. Esto hace que la búsqueda de una unidad de SCU adecuada para el trasplante sea más fácil y se reduzca el tiempo de búsqueda en comparación con otro tipo de donante (*Barker JN, 2002*), hecho especialmente importante para los pacientes que requieran un Alo-TPH de manera urgente.

Como ya se ha mencionado previamente, los criterios estándar actuales de selección de una unidad de SCU en cuanto a compatibilidad del CMH requieren el tipaje de los locus A- y B- por baja resolución y -DRB1 por alta resolución, aunque en los últimos tiempos se han realizado estudios donde se demuestra el impacto del grado de compatibilidad del CMH por alta resolución en los resultados post-TSCU. En el estudio realizado por Eapen et al (*Eapen M, 2011*) se estudió el impacto de la incompatibilidad del CMH por alta resolución de los locus A-, B-, -C- y -DRB1 en receptores de TSCU realizados con 1 única unidad de SCU, demostrando un peor injerto de neutrófilos y una mayor MRT en el caso de incompatibilidades en 5, 4 ó 3 alelos independientemente de la dosis celular infundida o la edad del paciente. En el trabajo realizado por Oran et al. (*Oran B, 2015*) también se estudió el impacto de la incompatibilidad del CMH por alta resolución en 4 locus (A-, B-, C- y -DRB1) en receptores de un dTSC y objetivaron una menor MRT en pacientes con grados de compatibilidad $\geq 5/8$. Otros grupos (*Brunstein CG, 2016; Mallhi KK, 2017; Amstrong AE, 2017*) también han estudiado el impacto del grado de compatibilidad del CMH por alta

resolución en 5 locus. La agrupación de los pacientes se realizó según mostraran grados de compatibilidad de 9-10/10, 6-8/10 y 2-5/10 y objetivaron que todos los grupos de pacientes obtenían resultados similares a excepción de la recaída, donde el grupo más favorecido fue el que tenía una compatibilidad de 2-5/10. Pese a que los trabajos anteriores tienen sus limitaciones, como por ejemplo el carácter retrospectivo, el hecho de conocer el grado de compatibilidad del CMH alélico podría ayudar a la selección de la unidad de SCU para proceder al trasplante.

Reconstitución inmune post-TSCU

Como ya se ha comentado previamente, las unidades de SCU contienen un número bajo de CNT siendo la mayoría linfocitos T *naïve* dando lugar a un tiempo de injerto prolongado y una pérdida de transferencia de linfocitos T memoria al receptor. Aunque la primera fase de reconstitución de linfocitos T tras el TSCU depende de una expansión de células T transferidas del inóculo, la reconstitución linfocitaria T permanente está mediada por un mecanismo central, el cual depende de la producción *de novo* de linfocitos T *naïve* en el timo del receptor desde progenitores linfo-mieloides (PLM) derivados del donante. La timopoyesis puede ser evaluada cuantificando los emigrantes tímicos recientes (ETR), los niveles de *T Restriction Excision Circles* (TRECS) y la diversidad del repertorio de receptores de células T (RCT). Estos tests son útiles para monitorizar la reconstitución tímica post-TSCU pero además han demostrado el gran valor pronóstico de ésta en los resultados del TSCU incluyendo las IO, la recaída y la SG. Como se ha comentado, las unidades de SCU contienen en su mayoría linfocitos T *naïve* antígeno-inexpertos los cuales no transfieren la función protectora propia de los linfocitos T al receptor. Por otro lado, los linfocitos T presentan disfunción en la capacidad efectora de la producción de citoquinas y una reducida actividad citolítica (*Risdon G, 1994; Chalmers IM, 1998*). Además, cabe destacar que las unidades de SCU contienen un gran número de linfocitos Tregs, los cuales presentan una mayor función supresora comparado con los linfocitos Tregs del adulto (*Godfrey WR, 2005*). Como consecuencia, el TSCU se asocia con una RI retrasada e incompleta debido a la pérdida de inmunidad adoptiva transferida, debido a un retraso del injerto de los PH y de la reconstitución de la linfopoyesis en el timo del receptor. Como resultado, las complicaciones infecciosas y reactivaciones virales siguen siendo las causas más importantes de morbi-mortalidad post-TSCU. En la Tabla 1 se muestran las características de las subpoblaciones celulares de la SCU en comparación con los PH de SP.

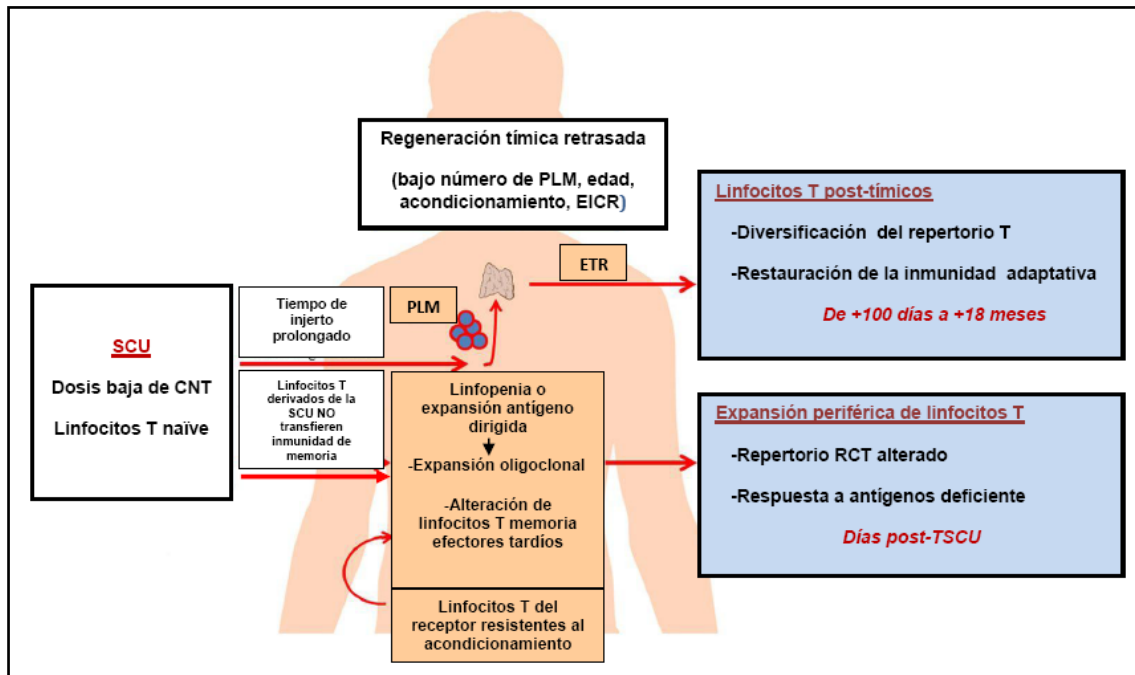
Tabla 1. Características de los diferentes tipos celulares de la SCU comparado con los PH de SP

TIPO CELULAR	CARACTERÍSTICA DE LA SCU COMPARADO CON SP
Linfocitos T	<p>Predominio de fenotipo <i>naïve</i></p> <p>Mayor susceptibilidad a la apoptosis</p> <p>Toxicidad mediada por Fas-L alterada</p> <p>Expresión CD40L infrarregulada</p> <p>Expresión de perforina infrarregulada</p> <p>Producción de citoquinas alterada</p> <p>Citotoxicidad antigénica reducida</p> <p>Sensibilidad a la ciclosporina aumentada</p>
Linfocitos T reguladores	<p>Predominio de fenotipo <i>naïve</i></p> <p>Disminución de la actividad supresora</p> <p>Expansión aumentada con estimulación <i>in vitro</i></p> <p>Producción de IL-10 aumentada</p>
Linfocitos B	<p>Subpoblación CD5 aumentada</p> <p>Producción de inmunoglobulinas alterada</p> <p>Mayor susceptibilidad a la apoptosis</p>
Células NK	<p>Mayor proporción de precursores NK</p> <p>Perfil de maduración incompleto</p> <p>Función citotóxica alterada</p> <p>Capacidad <i>killer in vivo</i> alterada</p> <p>Capacidad de anclaje alterada</p> <p>Capacidad <i>target células killer</i> alterada</p>
Células dendríticas	<p>Expresión de complejo mayor de histocompatibilidad II reducida</p> <p>Expresión de CD80 y CD86 reducida</p> <p>Respuesta reducida a la estimulación por citoquinas</p> <p>Aumento de la proporción de células plasmocitoides a dendríticas mieloides</p>

Tomado de Lucchini G, *Cytotherapy* 2015; 17: 711–722.

Mecanismos de reconstitución linfocitaria T tras el TSCU

Tras el TSCU se produce un periodo de absoluta linfocitopenia e inmunodeficiencia como resultado del acondicionamiento y del uso de inmunosupresores para prevenir el rechazo del injerto y la EICR. La RI cuantitativa o cualitativa del compartimento de linfocitos T es un proceso lento que puede extenderse a más de 1 año post-TSCU. En el periodo precoz post-TSCU la vía timo-independiente predomina, siendo mediada por los linfocitos T transferidos adoptivamente contenidos en el inóculo o por los linfocitos T del receptor que han sobrevivido al acondicionamiento. Estos linfocitos transferidos realizan una expansión homeostática en respuesta a la linfocitopenia y a los altos niveles de citoquinas que ocurre en el periodo precoz post-trasplante o la proliferación oligoclonal sobre la interacción con los antígenos afines. A diferencia de los PH de MO o de SP de adultos, los cuales se caracterizan por perfiles de receptores de linfocitos T oligoclonales y contienen un número considerable de linfocitos T memoria, la SCU contiene linfocitos T no experimentados contra antígenos, mostrando un repertorio de linfocitos T completo al nacer. Tras el TSCU la linfopenia impulsa una expansión homeostática de linfocitos T liderando una pérdida gradual del fenotipo *naïve* habiendo una transición a un fenotipo efector o de memoria. Estos cambios en la composición del *pool* de linfocitos T inmediatamente después del TSCU dan lugar a un repertorio alterado de linfocitos T el cual no es capaz de proteger contra el amplio espectro de antígenos. En la Figura 2 se muestra la reconstitución del compartimento de linfocitos T tras el TSCU.

Figura 2. Reconstitución del compartimento de linfocitos T

Tomado de Politikos I, Boussiotis VA. *Blood*. 2014 Nov 20;124(22):3201-11. El acondicionamiento con QT/RT antes de la infusión de la SCU da como resultado una linfopenia profunda e inmunodeficiencia del receptor. La reconstitución de las células T tras del TSCU se consigue mediante 2 mecanismos: la vía independiente predomina en el periodo post-trasplante precoz y está mediada por células T de la SCU transferidas adoptivamente, que son naïve y no transfieren memoria inmune protectora, o células T receptoras que sobreviven al acondicionamiento. Estas poblaciones de células T experimentan una expansión periférica en respuesta a la linfopenia y altos niveles de citoquinas (IL-7, IL-15, etc.), o proliferación oligoclonal por interacción con el antígeno correspondiente. Esta expansión temprana de las células T periféricas da como resultado una distorsión de las células T de memoria efectora tardía y una contracción de la diversidad del repertorio de células T, y se asocia con respuestas inmunológicas alteradas frente a antígenos. La reconstitución del compartimento de células T funcionalmente competente con una amplia especificidad antigénica requiere eventualmente la producción *de novo* de células T naïve en el timo del receptor. La vía timo-dependiente de la reconstitución de células T es un proceso prolongado de varios pasos. Los PLM contenidos la SCU o que surgen de los PH injertados migran por la circulación y repoblan el timo con precursores de timocitos que pueden reconstituir la timopoyesis. El timo proporciona el microambiente esencial (estroma) que apoya la proliferación de células T, la selección y la diferenciación en ETRs. Varios factores pueden influir en la recuperación de la timopoyesis tras el TSCU, como un bajo número de PLMs (como resultado de la baja dosis de células nucleadas de SCU y el retraso en el injerto), edad avanzada del receptor con involución y daño tímico por la QT del acondicionamiento o por la EICR. Aunque lento, el mecanismo dependiente del timo es imprescindible para la renovación de la acumulación de células T y la exportación constante de nuevas células T naïve con amplia diversidad del repertorio de RCT, capaces de responder a un gran espectro de antígenos.

La reconstitución del compartimento de linfocitos T funcionalmente competente y con especificidad antigénica depende de la producción *de novo* de linfocitos T naïve por parte del timo del receptor (Roux E, 2000). El proceso a través de la

vía timo-dependiente es un proceso prolongado, el cual se inicia con la migración de los PLM tras el injerto, los cuales circulan en la periferia y crecen en el timo del receptor. Los PLM inicialmente se sitúan en el córtex del timo donde se expanden junto con los linfocitos T bajo la influencia de la señalización de la vía Notch (*De Smedt M, 2002*). Además, el timo proporciona el microambiente esencial (o estroma) el cual permite la proliferación, diferenciación y selección de los linfocitos T vía citoquina IL-7, factor de queratinocitos, ligando 25 de la citoquina C-C motif (CCL25) y proteínas de superficie (receptores de citoquinas, complejos de péptidos/CMH), los cuales facilitan el tráfico y la interacción célula a célula (*Gill J, 2003*). Los timocitos sufren un reordenamiento secuencial del locus que codifica para las cadenas β - y α - del RCT, las cuales resultan en el ensamblaje de los $\alpha\beta$ -RCT y están sujetos a la selección positiva. Los timocitos seleccionados positivamente, se diferencian a timocitos CD4 o a CD8 de acuerdo con la restricción del RCT para reconocer moléculas del CMH de clase II o clase I respectivamente. Únicamente el pequeño porcentaje de linfocitos que han sido seleccionados positiva y negativamente abandonan el timo y son llamados emigrantes tímicos recientes (ETRs).

Independientemente de la fuente de PH, la eficiencia de la timopoyesis tras el Alo-TPH depende de varios factores, entre los que encontramos la edad del receptor, la intensidad del acondicionamiento y la presencia de EICR. En el caso concreto del TSCU, hay 2 factores en concreto a destacar. En primer lugar, el bajo número de PH contenidos en el inóculo resulta en un injerto tardío y salida de los PLM que emigran del timo reiniciando la timopoyesis. En segundo lugar, el alto grado de discordancia del CMH entre donante y receptor comparado con el resto de fuentes de PH, produce un efecto adverso intratímico afectando a la selección de linfocitos T. Específicamente, durante la selección positiva, las células epiteliales del córtex tímico (cCETs) que expresan CMH propio median la presentación de péptidos propios y seleccionan RCTs con afinidad intermedia para tales antígenos. Consecuentemente, las células T que sobreviven a la selección positiva son “comprometidas” durante la selección negativa en la médula tímica para

reaccionar con los péptidos propios presentados por las Células Epiteliales de la médula Tímica (mCETs) o por las CD derivadas de la MO. Aunque tras el Alo-TPH el origen de las cCETs y mCETs son del receptor, las CD son del donante. Por lo tanto, en relación a esto, se supone que el alto grado de incompatibilidad del CMH entre donante y receptor en el TSCU podría tener un impacto adverso en la RI de linfocitos T de la vía timo-dependiente, resultando en un repertorio alterado de los linfocitos T en la periferia (*Krenger W, 2008*) que persiste al menos durante el primer año post-TSCU (*Godthelp BC, 1999; Eyrich M, 2003*).

Valor y factores pronóstico de la reconstitución tímica tras el TSCU

El TSCU se asocia a una tasa elevada de IO comparado con otras fuentes de PH, especialmente por virus como herpesvirus, adenovirus y virus BK. El citomegalovirus (CMV) es el microorganismo oportunista que más morbimortalidad produce tras el Alo-TPH (*Walker CM, 2007*). En el caso del TSCU, el origen del CMV es exclusivamente por parte del receptor siendo la frecuencia de reactivación variable según los estudios publicados, dependiendo de las características del paciente y el estado serológico pre-trasplante de éste. Sin embargo, el riesgo de infección por CMV en los receptores de TSCU no se asocia al estado serológico del donante. La SCU no posee células de memoria CMV específicas que le puedan conferir inmunidad adoptiva contra éste, por lo que las consecuencias clínicas en los receptores son de gran importancia. En un estudio previo se publicó que la reactivación de CMV en una cohorte de 332 receptores de TSCU ocurría en un 51% de pacientes seropositivos, dato comparable a lo observado en los receptores de PH de adulto (*Beck JC, 2010*). Sin embargo, el 27.1% de los pacientes fueron diagnosticados de enfermedad por CMV, resultando en una elevada MRT y una disminución de la SG.

El valor pronóstico de la RI del timo va más allá de su influencia en la inmunidad patógeno-específica. El estudio del grupo COLBT (*Parkman R, 2006*) estudió el impacto clínico del desarrollo de inmunidad antígeno-

específica de los linfocitos T contra virus herpes (CMV, virus herpes simple y virus Epstein-Barr) en una cohorte de 117 pacientes pediátricos receptores de un TSCU afectos por LMA o leucemia linfoblástica aguda (LLA). Los receptores con una respuesta proliferativa positiva contra herpes virus en los primeros 3 años tuvieron una menor MRT por infección y además, un dato importante fue el menor riesgo de recaída de la leucemia. Por lo tanto, la reconstitución de la función tímica se correlaciona con un menor riesgo de recaída, ya que los pacientes que la sufrieron mostraban un nivel más bajo de TREC tanto antes del TSCU como a los +3m y +6m y viceversa. Tanto en población pediátrica como en adulta, los niveles elevados de TREC se correlacionan con la adquisición de inmunidad CMV-específica y con la ausencia de viremia de CMV e incluso se ha correlacionado una mejor supervivencia en pacientes capaces de desarrollar inmunidad específica contra CMV. Por lo tanto, la hipótesis existente es que la restauración de la función tímica implica tanto el desarrollo de inmunidad específica contra patógenos como contra antígenos tumorales (*Clave E, 2009*).

La evaluación de la función tímica a través de la cuantificación de ETRs, TRECs o de la diversidad del repertorio de RCT ha ayudado a conocer la cinética y los factores que afectan a la RI tímica tras el TSCU. Estudios previos donde se analiza la reconstitución linfocitaria tras el TSCU en población pediátrica (utilizando una única unidad de SCU) han demostrado que a pesar del retraso transitorio de la RI en los primeros meses post-TSCU, la RI a largo plazo es comparable a la del resto de modalidades de Alo-TPH (*Niehues T, 2001; Moretta A, 2001; Rénard C, 2011*). Esto traduce una relativa deficiencia de la vía timo-independiente, lo cual debe estar relacionado con el bajo número y las características biológicas de los PH de la SCU, aunque la vía timo-dependiente es eficiente y proporciona la RI linfocitaria durante el primer año post-TSCU. En este tipo de pacientes, el valor de TREC alcanza el nadir a los 3 meses post-TSCU, aunque hasta los 6 meses no se alcanzan los niveles pre-TSCU (*Clave E, 2013*). Al año post-TSCU los pacientes alcanzan niveles normales de TRECs, con un aumento concomitante del conteo de linfocitos T CD4+ y diversidad del repertorio de RCT (*Talveensari K, 2002; Chiesa R,*

2012). De hecho, a los 2 años post-TSCU el valor de TREC y la diversidad de repertorio de RCTs es superior en los receptores de TSCU que en receptores de PH de SP o MO de DE con compatibilidad del CMH idéntico.

En receptores adultos de un TSCU utilizando una única unidad de SCU que incluyó GAT en el acondicionamiento, se observó ausencia completa de TRECs de linfocitos T *naïve* y de memoria durante el primer año (*Komanduri KV, 2007*). Otro estudio también realizado en receptores adultos de TSCU con una única unidad de SCU (*Klein AK, 2001*), demostró un valor de TRECs por debajo del valor normal a los +36 meses post-TSCU. Sin embargo, se desconoce la causa de las diferencias entre niños y adultos pero se hipotetiza que podría deberse a la edad de los pacientes o a la dosis de PH recibidos.

De acuerdo con los datos previos, algunos autores han demostrado una temprana detección de los niveles de TRECs en adultos receptores de dTSCU tras AMA o AIR (*Brown JA 2010; Ballen K, 2012*). Se objetivaron unos niveles de TRECs a los +100 días por encima de la mediana en la mayoría de receptores. Sin embargo, los niveles normales de TRECs no se objetivaron hasta +1 y +2 años post-TSCU. Otros grupos que han analizado la diversidad del repertorio de los RCT, han objetivado una mayor diversidad de éste en pacientes receptores de dTSCU comparado con Alo-TPH de SP con DCT o convencional (*van Heijst, 2013*), siendo la diferencia más acusada en los receptores de dTSCU debido a un mayor número de PLM. Estos hallazgos sugieren una mejora tanto cuantitativa como cualitativa de la RI tras el dTSCU comparado con el TSCU con una única unidad de SCU.

Además de la infusión de 1 ó 2 unidades de SCU, hay otros factores que pueden afectar a la RI tímica. La edad avanzada del receptor, ha sido asociada con el retraso de la reconstitución de TRECs y linfocitos T *naïve*, por lo que el riesgo de IO es mayor y por lo tanto la supervivencia es menor (*Clave E, 2009; Sairafi D, 2012*). En el contexto del TSCU utilizando una única unidad de SCU, los receptores adultos muestran una reconstitución tímica más retrasada que los receptores pediátricos, por lo que se supone que la dosis celular de CNT/kg es variable según la edad del receptor y tiene influencia sobre este hecho.

El timo es órgano diana de la EICR afectando tanto al compartimento epitelial como al estroma linfoide. Como consecuencia de la EICR del timo, éste sufre una distorsión de la arquitectura normal, por lo que se produce una timopoyesis defectuosa (*Krenger W, 2008*). Estudios previos han demostrado que tanto la EICRa como la EICRc son factores determinantes con impacto en la reconstitución tímica tras el Alo-TPH y se asocia a una reducción de linfocitos T naïve, TRECs y del repertorio de RCT (*Weinberg K, 2001; Clave E, 2009; Uhlin M, 2012*). Además, los inmunosupresores empleados para el tratamiento de la EICR también actúan de manera adversa en la timopoyesis (*Hiramine C, 1988; Kosugi A, 1989*). Otro factor que puede influir sobre la reconstitución tímica es la intensidad del acondicionamiento. La QT y RT tienen un impacto negativo sobre la timopoyesis (*Mackall CL, 1995; Chung B, 2001*) en la generación ETRs. Teóricamente, el AIR causa menos daño sobre el timo resultando en una producción más rápida de linfocitos T naïve. En relación a esto, hay autores que demostraron que la intensidad del acondicionamiento fue el factor más importante con influencia en la producción de TREC y linfocitos T CD4+ naïve en los primeros 6 meses post Alo-TPH (*Jiménez M, 2005*). Otros estudios previos también demostraron que los pacientes receptores de un TSCU (utilizando una unidad de SCU) tras AIR, desarrollaron una reconstitución tímica más rápida y un repertorio de RCT más diverso comparado con los pacientes receptores de TSCU tras AMA utilizando la misma dosis de GAT, la misma profilaxis de EICR y el mismo tratamiento de soporte (*Chao NJ, 2002*). En otro trabajo realizado en pacientes receptores de TSCU se demostró que el AIR fue un factor pronóstico independiente para la reconstitución de TREC (*Uhlin M, 2012*). Otros factores con impacto sobre la reconstitución tímica son el uso de GAT, la ICT y los niveles de TREC pre-TPH (*Talvensaari K, 2002*).

Estrategias de mejora de la reconstitución inmune tras el TSCU

Como ya hemos comentado previamente, otra carencia importante del TSCU es la RI linfocitaria tardía. Para su mejora, también se han propuesto algunas alternativas. La DCT usando GAT, alemtuzumab o selección positiva de CD34+ tiene un gran impacto sobre la reconstitución linfocitaria T, así que hay grupos que han eliminado su uso en el contexto de administración de AMA. Varios grupos (*Sauter, 2011; Chiesa, 2012*) analizaron la RI linfocitaria tras TSCU con omisión de la DCT *in vivo* objetivando una rápida expansión de linfocitos T CD4+ post-TSCU y por lo tanto una mortalidad por IO baja e incidencia de EICRa grado II-IV igual o levemente más elevada y con una SG aceptable. Además, algunos grupos han objetivado una disminución del riesgo de recaída consecuente a una rápida recuperación linfocitaria T tras evitar la DCT. Otros grupos también han omitido la DCT tras el uso de AIR (*Ponce DM, 2013*) y observaron una incidencia de EICRa, EICRc, MRT y recaída baja destacando que ningún paciente falleció por causa infecciosa de manera directa.

Otra de las alternativas para mejorar la RI linfocitaria ha sido el uso de 2 unidades de SCU. Varios grupos (*Sauter, 2011; Jacobson CA, 2012; Saliba RM, 2015*) han estudiado los resultados tras el TSCU infundiendo 2 unidades de SCU utilizando AMA vs AIR administrando GAT y también eliminándola. Tras analizar los resultados post-TSCU se concluyó que el factor de riesgo independiente con impacto en la RI era el uso de la GAT y no el hecho de usar 2 unidades de SCU. Por lo tanto, la infusión de 2 unidades de SCU parece que no tuvo impacto en la cinética de la RI post-TSCU comparado con la infusión de 1 unidad en estos estudios.

La generación de linfocitos T anti-virus multiespecíficos a partir la SP de un tercer donante que muestre seropositividad para el o los virus en concreto también es una estrategia empleada por tal de mejorar la RI tras el TSCU. Los trabajos publicados previamente (*Barker JN; 2010; Micklethwaite, 2010; Hanley P, 2013; Delaney C, 2013*) demuestran la eficacia de esta terapia para el tratamiento de infecciones virales potencialmente graves pudiendo llegar a

negativizar la carga viral y mostrando ser seguros ya que no se objetivó incidencia de EICRa grado \geq II.

La infusión de citoquinas tras el Alo-TPH también se ha estudiado previamente ya que éstas poseen capacidad para mejorar la función tímica (*Politikos I, 2017*). La administración de IL-7 ha demostrado tener un efecto beneficioso en la timopoyesis promoviendo la supervivencia y proliferación de linfocitos T *naïve* (*Sportès C, 2008; Politikos I, 2015*). Perales MA et al (*Perales MA, 2011*) analizaron el efecto de la IL-7 tras Alo-TPH de donantes con compatibilidad del CMH 8/8 con DCT y objetivaron un aumento significativo en el número y funcionalidad de linfocitos T CD4+ y T CD8+. Sin embargo, no se objetivó un aumento en la incidencia de EICR, aunque cabe destacar que esta estrategia no se ha usado en el contexto del TSCU.

Por otro lado, en los últimos años se han explorado diferentes técnicas de expansión *ex vivo* de células de SCU con tal de mejorar el injerto mieloide y el *homing* sin saber con certeza el rol de esta mejora sobre la RI. También se han estudiado otras estrategias como la expansión de linfocitos Treg o linfocitos NK con el objetivo de mejorar los resultados tras el TSCU disminuyendo la EICR y/o mejorando la RI (*Brunstein CG, 2011; Brunstein CG, 2016; Saudemont A, 2016*)

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Justificación del estudio

Los dos trabajos presentados en esta Tesis Doctoral siguen un hilo argumental común en torno al conocimiento de la RI tras el TSCU en pacientes con neoplasias hematológicas y enfermedades no neoplásicas.

Este proyecto de investigación comenzó con dos trabajos previos realizados por este grupo que sirvieron para analizar los resultados del TSCU en nuestro medio. El primero estudió la frecuencia y la naturaleza de los eventos adversos tras la infusión de los PH de SCU y el segundo demostró los factores pronósticos biológicos de la SCU y su impacto en los resultados globales del TSCU. Estos dos trabajos fueron publicados en 2015 en *Biology of Blood and Bone Marrow Transplantation* (Castillo N, 2015).

Dichos trabajos previos a los que conforman esta tesis sirvieron para sistematizar el universo de casos de TSCUs que se habían realizado en los hospitales de Cataluña los cuales comparten el centro de procesamiento del BST y así conocer los resultados clínicos globales como los tiempos de injerto y la supervivencia. La discusión de los mismos motivó la necesidad de estudiar la RI post-TSCU especialmente debido a la demostración de una elevada mortalidad por IO.

El primero de los dos trabajos que conforman la actual tesis fue publicado en 2015, y tuvo como objetivo hallar los factores predictivos de la RI temprana expresada en contaje absoluto de linfocitos (CAL) y a su vez conocer el impacto de un valor de corte determinado de esta cifra sobre los resultados post-TSCU.

En el segundo trabajo que conforma esta tesis, publicado en 2016, se describió la cinética de la RI de cada una de las subpoblaciones linfocitarias y se analizaron los factores predictivos de éstas tras el TSCU.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Hipótesis de estudio de la tesis

La hipótesis bajo la cual se ha desarrollado la actual Tesis Doctoral es que la elevada mortalidad de causa infecciosa tanto en el periodo precoz como tardío post-TSCU se debe a una RI alterada, hecho que está relacionado con factores inmunogenéticos pre-TSCU.

Objetivos

A pesar que el periodo de investigación sobre diferentes aspectos relacionados con el TSCU en nuestro medio ha proporcionado la oportunidad de la publicación de 4 artículos científicos, esta Tesis Doctoral incluye los 2 últimos dentro de su línea argumental, ya que pertenecen al tema principal de dicha tesis.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es el análisis de la cinética de la RI tras el TSCU y establecer los factores predictivos de ésta tanto en pacientes con neoplasias hematológicas como con enfermedades no neoplásicas.

Para ello, se han concretado objetivos específicos, requiriendo cada uno de ellos un estudio concreto:

1-Estudio de los factores predictivos de la reconstitución inmune temprana y su impacto en los resultados del TSCU en pacientes con neoplasias hematológicas y enfermedades no neoplásicas.

1.1-Análisis de la cinética de la recuperación del contaje absoluto de linfocitos durante el periodo precoz post-TSCU.

1.2-Análisis de los factores con influencia sobre la recuperación del CAL tras el TSCU.

1.2.1-Impacto de los factores pre-TSCU relacionados con el paciente.

1.2.2-Impacto de los factores pre-TSCU relacionados con la unidad de SCU.

1.2.3-Impacto de los factores pre-TSCU relacionados con el procedimiento.

1.3-Análisis del impacto del CAL sobre los resultados globales post-TSCU.

2-Estudio cinético de la reconstitución de las diferentes subpoblaciones linfocitarias y de los factores asociados a su recuperación tras el TSCU en pacientes con neoplasias hematológicas y enfermedades no neoplásicas.

2.1-Análisis de la cinética de recuperación linfocitaria de cada una de las subpoblaciones de linfocitos tanto en el periodo precoz como tardío post-TSCU.

2.2-Análisis del impacto de los factores pre-TSCU sobre cada una de las subpoblaciones linfocitarias.

2.3-Descripción de la frecuencia de los diferentes tipos de infección por periodos determinados post-TSCU.

RESULTADOS

Resultados

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

Artículo 1: *Castillo N, García-Cadenas I, Díaz-Heredia C et al. Cord Blood Units with High CD3(+) Cell Counts Predict Early Lymphocyte Recovery After in vivo T Cell-Depleted Single Cord Blood Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2016; 22 (6): 1073-9.*

Artículo 2: *Castillo N, García-Cadenas I, Barba P et al. Early and long-term impaired T-lymphocyte immune reconstitution after cord blood transplantation with antithymocyte globulin. Biol Blood Marrow Transplant. 2017 Mar;23(3):491-497.*

Objetivo 1:

1-Estudio de los factores predictivos de la reconstitución inmune temprana y su impacto en los resultados del TSCU en pacientes con neoplasias hematológicas y enfermedades no neoplásicas.

RESUMEN

En este trabajo estudiamos los factores predictivos de la reconstitución inmune (RI) linfocitaria medida a través del conteo absoluto de linfocitos (CAL) tras el trasplante de sangre de cordón umbilical (TSCU). Para ello, analizamos a los pacientes que recibieron un TSCU en Barcelona entre 2005 y 2014. Una vez hallados los factores predictivos de la RI de linfocitos totales, establecimos un $CAL \geq 300 \text{ cel}/\mu\text{L}$ en el día +42 post-TSCU (CAL42) para estudiar su impacto sobre los resultados globales tras el TSCU.

Se estudiaron retrospectivamente los factores asociados a la RI temprana del $CAL_{42} \geq 300 \times 10^6/\text{L}$ y a su vez el impacto de este valor en los resultados globales post-TSCU en 210 pacientes pediátricos y adultos (112 hombres, mediana de edad 15 años, rango 0.3-60 años, rango intercuartílico 4-36 años) que recibieron un TSCU con una única unidad de SCU, con acondicionamiento mieloablatoivo (AMA) y con depleción de células T *in vivo* afectos por enfermedades hematológicas malignas y enfermedades no malignas. En un modelo de regresión logística multivariante, los factores que favorecieron un CAL42 más elevado fueron la dosis mayor de CD3+ infundida (odds ratio [OR], 2.7; IC95%, 1.4-5.2; $P = 0.004$), una menor dosis de globulina antitumoral [GAT, (OR 2.3; IC95%, 1.2-4.5; $P = 0.01$)] y una mayor compatibilidad del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) entre donante y receptor [(OR, 2.1; IC95%, 1.1-4.1; $P = 0.03$)]. En el análisis multivariante, un $CAL_{42} < 300 \times 10^6/\text{L}$ se asoció con una mayor mortalidad relacionada con el trasplante (MRT, hazard ratio [HR], 1.76; IC95%, 1.34-2.32; $P = 0.001$), mientras que un $CAL_{42} \geq 300 \times 10^6/\text{L}$ se asoció con una mayor supervivencia libre de enfermedad [SLE,

(HR, 2.03, IC95% 1.15-3.6; $P < 0.001$) y supervivencia global [(SG, HR, 2.03; IC95%, 1.17-3.6; $P < 0.001$).

La conclusión de este trabajo fue que la selección de las unidades de SCU con una mayor compatibilidad del CMH y una dosis más elevada de linfocitos CD3+ junto con el uso de regímenes de acondicionamiento con dosis más bajas de GAT podría mejorar la RI tras de TSCU.

JUSTIFICACIÓN

Una vez conocida la efectividad del TSCU para conseguir remisiones a largo plazo, nuestro estudio objetivó una elevada incidencia y mortalidad causada por infecciones, así que el siguiente paso fue describir la cinética de la RI, hallar los factores predictivos de ésta y su impacto sobre los resultados globales del TSCU. Para ello, estudiamos pacientes receptores de TSCU que incluyeron GAT en el acondicionamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Un total de 253 pacientes recibieron un TSCU en diferentes centros entre enero de 2005 y agosto de 2014. Fueron excluidos del análisis los pacientes que recibieron un segundo TSCU ($n = 7$), un TSCU de DE ($n = 14$), co-infusión de médula ósea con una unidad de SCU ($n = 5$) o la infusión de una unidad de SCU y células CD34+ seleccionadas de un donante haploidéntico ($n = 17$). La cohorte de estudio incluyó a 210 pacientes (110 [52%] pediátricos y 100 adultos) que recibieron un TSCU con una sola unidad de SCU en el Hospital Vall d'Hebron, Hospital de Sant Pau e ICO-Hospital Germans Trias i Pujol, que constan en total de 3 programas de trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) para adultos y 2 programas de TPH pediátrico.

Criterios de inclusión

Para la inclusión en este estudio fueron elegibles todos los pacientes con una enfermedad hematológica maligna o no maligna y enfermedades no hematológicas si no disponían de un DNE con compatibilidad del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en un tiempo óptimo después de la búsqueda en los registros internacionales y se disponía de una unidad de SCU adecuada tal y como se describe a continuación. Este estudio se realizó de acuerdo con la aprobación regulatoria local. Los pacientes o sus tutores proporcionaron el consentimiento informado por escrito para su inclusión en cada protocolo de trasplante y para la recogida de datos de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes incluidos en el análisis recibieron un primer y único TSCU.

Dosis celular

Todas las unidades de SCU se descongelaron y lavaron por centrifugación el mismo día de la infusión. Se extrajo una alícuota del producto final para el análisis antes de infundir la unidad de SCU. Esta muestra se procesó para medir la cantidad de células nucleadas totales (CNT), se realizó citometría de flujo para la evaluación del producto incluyendo recuentos de células CD34+ y células CD3+ utilizando una plataforma única y también se evaluó la viabilidad celular por 7-aminoactinomicina-D utilizando la modificación ISAGHE. Para la evaluación funcional celular de las unidades de SCU, se realizó el test de unidades formadoras de colonias (UFC) tras la descongelación.

Procedimiento del Trasplante y Selección de las unidades de SCU

Todos los pacientes recibieron un AMA antes de la infusión de los PH de SCU. El régimen de acondicionamiento más utilizado estuvo basado en tiotepa (10 mg/kg iv), fludarabina (150 mg/m² iv), busulfán (9.6 mg/m² iv) y depleción de células T (DCT) *in vivo* con globulina antitimocítica (GAT) a dosis de 6-10

mg/kg iv. La GAT se administró a partir del día -5 ó -4 hasta el día -2, dependiendo de la dosis total administrada.

La profilaxis de la enfermedad injerto contra receptor (EICR) se realizó con ciclosporina A (CsA) 1.5 mg/kg/12 horas iv, seguida de 3 a 5 mg/kg/12 horas por vía oral cuando fue posible la ingesta oral y la retirada se realizó entre los días +90 a +180 si era factible. La CsA se combinó con un ciclo corto de corticoides (1 mg/kg/día) desde el día +14 a +28 o con micofenolato de mofetilo [(MFM), 15 mg/kg/día desde el día -1 al día +30]. Como tratamiento de soporte, todos los pacientes recibieron factor estimulante de colonias de granulocitos (FEC-G) desde el día +7 hasta la recuperación de neutrófilos.

En los pacientes adultos, la dosis celular pre-criocriopreservada recomendada fue de unas CNT $\geq 1.5 \times 10^7/\text{kg}$ y CD34+ $\geq 0.6 \times 10^5/\text{kg}$. Se requirió un grado de compatibilidad del CMH entre la unidad de SCU y el receptor de al menos 4/6 (considerando CMH-A y -B a nivel antigénico y -DRB1 al nivel alélico). Para los pacientes pediátricos con enfermedades malignas, el recuento mínimo de células pre-criopreservadas recomendada fue de CNT $\geq 3 \times 10^7/\text{kg}$ y CD34+ $\geq 1.5 \times 10^5/\text{kg}$ para una compatibilidad del CMH 4/6. Para los niños con enfermedades no malignas, la dosis mínima celular recomendada pre-criopreservada fue de unas CNT $\geq 5 \times 10^7/\text{kg}$ y CD34+ $\geq 2 \times 10^5/\text{kg}$ para una compatibilidad 5/6 del CMH.

Definiciones

Injerto mieloide

El injerto de neutrófilos se definió como el primero de 3 días consecutivos con un conteo absoluto de neutrófilos (CAN) $\geq 0.5 \times 10^9/\text{L}$ y plaquetas $\geq 20 \times 10^9/\text{L}$ sin requirimiento transfusional durante 7 días, respectivamente.

Injerto sostenido del donante

El injerto se definió como la recuperación hematológica sostenida derivada del donante con quimerismo completo (QC; $\geq 95\%$ de hematopoyesis del donante). El QC del donante se determinó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) cuantitativa de las regiones polimórficas de repetición en tándem del ADN del donante y del receptor usando el Kit de Amplificación de RCP AmpFISTR Identifier Plus (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Se consideró que los pacientes que sobrevivieron ≥ 42 días después del TSCU y que no mostraron injerto mieloide presentaron un fallo de implante primario. El fallo de implante secundario se definió como la pérdida de injerto.

Evaluación de la enfermedad injerto contra receptor, mortalidad relacionada con el trasplante, mortalidad relacionada con la infección oportunista, recaída, supervivencia libre de enfermedad, supervivencia global y estado de la enfermedad

Los receptores fueron evaluados semanalmente para monitorizar el desarrollo y la clasificación de la EICR aguda (EICRa). La EICRa y EICR crónica (EICRc) fueron diagnosticadas y clasificadas de acuerdo con los criterios estándar. Los pacientes que murieron antes del día +100 no fueron considerados para el análisis de la EICRc. La MRT se definió como la muerte por cualquier causa sin evidencia de recaída. La mortalidad relacionada con la infección oportunista (IO) se definió como la muerte por infección viral, fúngica o por protozoos. La supervivencia libre de enfermedad (SLE) se definió como la supervivencia desde el momento del trasplante sin evidencia de recaída de la enfermedad. La supervivencia global (SG) se definió como la supervivencia desde el momento del trasplante. El estado de la enfermedad en el momento del trasplante se clasificó de la siguiente manera: fase temprana: leucemia aguda, síndrome mielodisplásico (SMD) y linfoma en primera remisión completa, SMD con blastos $<5\%$ sin tratar y/o leucemia mieloide crónica (LMC) en primera fase crónica; fase intermedia: leucemia aguda, linfoma o SMD en segunda remisión

y LMC en segunda o más fase crónica o acelerada; fase avanzada: leucemia aguda y linfoma no en remisión, LMC en crisis blástica y anemia refractaria con exceso de blastos no tratada.

Análisis estadístico

El análisis univariado exploratorio preliminar demostró una asociación positiva entre el CAL42 $< 300 \times 10^6/L$ (la mediana de CAL42 de toda la cohorte fue de $345 \times 10^6/L$) y una peor supervivencia tras del trasplante; por lo tanto, utilizamos dicho valor del CAL en el día +42 en nuestro análisis univariado y multivariado. A continuación, se evaluó la asociación de los factores predictivos del CAL $\geq 300 \times 10^6/L$. Los pacientes que fueron diagnosticados de fallo de implante primario ($n = 9$), recaída ($n = 1$), cualquier grado de EICRa ($n = 18$) y los que fallecieron ($n = 14$) antes del día +42 fueron excluidos del análisis ($N = 42$) con el fin de evitar su influencia en el CAL42. Se realizó un análisis de regresión logística binaria univariado y multivariado para estimar la asociación de los factores predictivos de alcanzar un CAL $\geq 300 \times 10^6/L$. Las variables seleccionadas para su inclusión en el modelo multivariado fueron aquellas con asociación en el análisis univariado ($P < 0.10$). Los resultados se expresaron como odds ratio (OR) y el correspondiente intervalo de confianza del 95% (IC95%).

A continuación, se estimó la incidencia acumulada de injerto, MRT, EICR, recaída y también se calculó la probabilidad de SLE y SG en toda la cohorte. A continuación, se analizaron los factores de riesgo para los resultados globales post-TSCU incluyendo el CAL42 $\geq 300 \times 10^6/L$, utilizando un análisis de *landmark* en el día +42 en toda la cohorte. Las curvas de incidencia acumulada se utilizaron en un modelo de riesgos competitivos para calcular la incidencia acumulada de injerto de neutrófilos y plaquetas, EICRa, EICRc, recaída y MRT. Para realizar el análisis multivariado se utilizó un modelo de riesgo proporcional de Cox o el método de Fine and Gray para eventos competitivos. La muerte sin evidencia de injerto fue el evento competitivo para el injerto de neutrófilos y

plaquetas y la muerte sin recaída fue el evento competitivo de la recaída. La recaída o muerte sin desarrollo de EICRa o EICRc fue el evento competitivo de EICRa y EICRc, respectivamente. La probabilidad de supervivencia se calculó utilizando la estimación de Kaplan-Meier y la comparación se realizó utilizando el test de *log-rank*. Las características basales se reportaron como mediana, rango y rango intercuartílico (RIC) para las variables cuantitativas y como frecuencia y porcentajes para las variables categóricas. Las características seleccionadas para su inclusión en el modelo multivariado fueron aquellas con asociación en el análisis univariado ($P < 0.10$). Todas las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el programa SPSS versión 20.0 (IBM, Armonk, NY). La incidencia acumulada con riesgos competitivos se analizó utilizando la versión R 3.1.1 (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria).

RESULTADOS

Características de los pacientes y las unidades de SCU

Las características de los 210 pacientes del estudio se resumen en la Tabla 2. Durante el período de estudio, 210 pacientes consecutivos recibieron un TSCU con una única unidad de SCU de DNE con AMA. La mediana de edad en el momento del trasplante fue de 15 años (rango, 0.3-60 años, RIC, 4-36 años). La mayoría de los pacientes tenían leucemia aguda ($n = 152$; 72%). Entre los pacientes diagnosticados de una enfermedad maligna ($n = 183$; 87%), 102 (56%) se encontraban en fase precoz antes del TSCU, 49 (27%) en fase intermedia y 32 (17%) en fase avanzada. Respecto a la compatibilidad del CMH entre el receptor y la unidad de SCU, fue 6/6 en 35 pacientes (17%), 5/6 en 90 pacientes (43%) y 4/6 en 85 pacientes (40%). La mediana de seguimiento fue de 48.3 meses (rango, 7-108 meses). De acuerdo con los criterios de inclusión descritos anteriormente, un total de 168 pacientes fueron evaluables en este estudio. La mediana del recuento de CNT, CD34+ y CD3+ fue de $3.4 \times 10^7/\text{kg}$ (rango 0.2-26.3, RIC, 2.4-6.5 $\times 10^7/\text{kg}$), $1.3 \times 10^5/\text{kg}$ (rango

0.1-22.7, RIC, 0.9-2.4 x 10⁵/kg) y 4.2 x 10⁶/kg (rango, 0.5-89.6 x 10⁶/kg, RIC, 3.4 a 11 x 10⁶/kg), respectivamente. Noventa pacientes (43%) recibieron una unidad de SCU con incompatibilidad del grupo ABO.

Tabla 2. Características de los pacientes y unidades de SCU (N = 210)

CARACTERÍSTICA	N (%) ^a
Año de trasplante	
2005-2009	105 (50)
2010-2014	105 (50)
Sexo	
Hombres	112 (53)
Edad al trasplante, años	
Mediana (rango, RIC)	15 (0.3-60, 4-36)
Tiempo desde el diagnóstico hasta el trasplante (meses)	
Mediana (rango, RIC)	11.5 (0.5-181, 8-14)
Estado serológico del CMV del receptor	
Positivo	144 (69)
Negativo	66 (31)
Acondicionamiento	
TT-FLU-BU-GAT-GAT	123 (59)
TT-FLU-CY-GAT	6 (3)
VP16-CY-TBI-GAT	34 (16)
CY-TBI-GAT	3 (1)
BU-CY-GAT	12 (6)
BU-CY-MEL-GAT	6 (3)
FLU-MEL-GAT	5 (2)
FLU-CY-GAT	6 (3)
BU-CY-MEL-GAT	6 (3)
FLAG-IDA-MEL-GAT	5 (2)
Treasulfan-CY-GAT	4 (2)
Tipo de enfermedad de base	
Maligna	180 (86)
No maligna	30 (14)

^aContinuación adelante.

Tabla 2 (continuación). Características de los pacientes y unidades de SCU (N = 210)

CARACTERÍSTICA	N (%) ^a
Enfermedad de base	
LMA	69 (33)
LLA	83 (40)
LH	9 (4)
LNH	5 (2)
SMD	5 (2)
LMC	8 (4)
LMMC	4 (2)
Inmunodeficiencia	21 (10)
Metabolopatía	6 (3)
Fase de la enfermedad ^b	
Precoz	102 (56)
Intermedia	49 (27)
Avanzada	32 (17)
Profilaxis EICR	
CsA-PDN	120 (57)
CsA-MFM	90 (43)
Compatibilidad CMH ^c	
4/6	85 (40)
5/6	90 (43)
6/6	35 (17)
Incompatibilidad grupo ABO	
Mayor	90 (43)
Menor	50 (24)
Ninguna	70 (33)
Dosis GAT	
6 mg/kg	118 (56)
7.5 mg/kg	42 (20)
8 mg/kg	34 (16)
10 mg/kg	16 (8)
Dosis CNT post-descongelación	
Mediana (rango, RIC)	3.4(0.2-26.3, 2.4-6.5)
Dosis CD34+ post-descongelación	
Mediana (rango, RIC)	1.3(0.1-22.7, 0.9-2.1)
Dosis CD34+ post-descongelación	
Mediana (rango, RIC)	4.2(0.5-89.6, 3.4-11)

RIC indica rango intercuartílico; CMV; citomegalovirus, TT, tiotepa; FLU, fludarabina; BU, busulfán; GAT, globulina antitímocítica; CY, ciclofosfamida; VP16, etopósido; ICT, irradiación corporal total; MEL, melfalán; FLAG, fludarabina-AraC-G-CSF-G (FEC-G); IDA, idarrubicina, LMA, leucemia mieloide aguda; LLA, leucemia linfoblástica aguda; LH, linfoma de Hodgkin; LNH, linfoma no Hodgkin; SMD, síndrome mielodisplásico; LMC, leucemia mieloide crónica; LMMC, leucemia mielomonocítica crónica; EICR, enfermedad injerto contra receptor; CsA, ciclosporina A; PDN, prednisona; MFM, micofenolato mofetilo; CMH, complejo mayor de histocompatibilidad; CNT, células nucleadas totales.^a Los porcentajes pueden no sumar 100 debido al redondeo. ^bSólo se consideraon pacientes diagnosticados de hemopatías maligna. ^cConsiderando el CMH-A y -B a nivel antigénico y -DRB1 a nivel de alélico.

Factores predictivos asociados a la reconstitución de linfocitos

Los factores predictivos de la reconstitución del $CAL42 \geq 300 \times 10^6/L$ en el análisis univariado fueron el diagnóstico de una enfermedad no maligna, la fase precoz de la enfermedad, el estado serológico negativo del CMV del receptor, el injerto de neutrófilos en el día +42, una dosis menor de GAT, una mayor compatibilidad del CMH y una mayor dosis de CNT, CD34+ y CD3+ infundida (Tabla 3). En el análisis multivariado, una dosis mayor de células CD3+ infundida (OR, 2.7, IC95%, 1.4-5.2, $P = 0.004$), una menor dosis de GAT (OR, 2.3; IC95%, 1.2-4.5; $P = 0.01$) y una mayor compatibilidad del CMH (OR, 2.1, IC95%, 1.1-4.1, $P = 0.03$) permanecieron como factores predictivos del $CAL42 \geq 300 \times 10^6/L$ (Tabla 4). Las variables que no permanecieron estadísticamente significativas en el análisis multivariado fueron la edad del receptor (OR, 1.9, IC95%, 0.4-1.71, $P = 0.26$), el sexo (OR, 1.8, IC95%, 0.6-1.9, $P = 0.23$), la enfermedad de base (OR, 2.2, IC95%, 0.5-3.2, $P = 0.32$), la fase de la enfermedad antes del trasplante (OR, 2.1, IC95%, 0.42- 2.4, $P = 0.34$), haber recibido un trasplante autólogo de SP (TASP) previo al TSCU (OR, 3.3; IC95%, 0.28-6.2; $P = 0.19$), el estado serológico del CMV del receptor (OR, 2.5; IC95%: 0.1-4.2; $P = 0.80$), la incompatibilidad del grupo ABO (OR, 1.9; IC95%, 0.6-3.4, $P = 0.26$), el $CAN \geq 500 \times 10^6/L$ (OR, 2.06; IC95%, 0.1-4.8; $P = 0.20$), la profilaxis de EICR (OR, 2.12; IC95%, 0.3-3.8, $P = 0.20$), la dosis de CNT (OR, 2.43, IC95%, 0.12-3.7, $P = 0.3$) y la dosis de CD34+ (OR, 3.1; IC95% 4.6; $P = 0.10$).

Table 3. Análisis Univariado de los Factores Predictivos de la Reconstitución de Linfocitos

Característica	OR (IC95%)	P-valor
Edad (años) ≤ 20* > 20	1.44 (0.82-2.53) 1	0.2
Sexo Hombre* Mujer	1 1.12 (0.1-2.18)	0.69
Enfermedad de base No maligna Maligna*	2.4 (0.98-5.9) 1	0.06
Estado de la enfermedad al trasplante Precoz Intermedia-avanzada*	1.63 (1.2-2.39) 1	0.04
TASP Sí* No	1 1.12 (1.01-1.22)	0.78
Estado serológico CMV receptor Negativo* Positivo	1.8 (1.49-2.62) 1	0.02
Incompatibilidad de grupo ABO No* Mayor Menor	1 0.93 (0.46-1.94) 1.37 (0.55-3.42)	0.48
CAN ≥ 500 x 10 ⁶ /L < 42 días post-TSCU* ≥ 42 días post-TSCU	1 1.87 (1.2-2.2)	0.07
Dosis GAT ≤ 6 mg/kg* > 6 mg/kg	2.9 (1.57-5.03) 1	< 0.001
Profilaxis EICR CsAPDN* CsAMFM	1 1.47 (0.51-1.61)	0.74
Compatibilidad CMH 4/6* 5-6/6	1 2.8 (2.36-3.24)	< 0.001
Dosis CNT post-descongelación (x10 ⁷ /kg) < 2.5 ≥ 2.5 *	1 2.42 (1.9-2.92)	0.004
Dosis CD34+ post-descongelación (x10 ⁵ /kg) < 1* ≥ 1	1 1.67 (0.71-0.96)	0.073
Dosis CD3+ post-descongelación (x10 ⁶ /kg) < 4* ≥ 4	1 3.5 (3.1-3.85)	< 0.001

OR odds ratio; IC, intervalo de confianza; TASP, trasplante autólogo de sangre periférica TASP; CMV, citomegalovirus; CAN, conteo absoluto de neutrófilos; TSCU, trasplante de sangre de cordón umbilical; GAT, globulina antitímocítica; EICR, enfermedad injerto contra receptor; CsA, ciclosporina;

*PDN, prednisona; MFM, micofenolato de mofetilo; CMH, complejo mayor de histocompatibilidad; CNT, células nucleadas totales. * Categoría de referencia.*

Tabla 4. Análisis Multivariado de los Factores de Riesgo asociados a la Recuperación de Linfocitos según las Características del Paciente y de las unidades de SCU

Característica	OR (IC95%)	P-valor
Compatibilidad del CMH		
4/6*	1	0.03
5-6/6	2.1 (1.1-4.1)	
Dosis GAT		
≤ 6 mg/kg	2.3 (1.2-4.5)	0.01
> 6 mg/kg*	1	
Dosis CD3+ post-descongelación (x10 ⁶ /Kg)		
< 4*	1	0.004
≥ 4	2.7 (1.4-5.2)	

*OR indica odds ratio; IC, intervalo de confianza; CMH, complejo mayor de histocompatibilidad; GAT, globulina antitímocítica. *Categoría de referencia.*

Resultados generales y factores de riesgo

Los resultados del análisis multivariado para los resultados globales del TSCU se resumen en la Tabla 5. Los resultados del análisis univariado se muestran en la Tabla 6 y 7.

Injerto mieloide

Catorce pacientes (7%) fallecieron antes de haber injertado (mediana, 17 días, rango, 13-25 días) así que no fueron evaluables para este evento. Nueve de 196 (5%) pacientes presentaron un fallo de implante primario. Los restantes 187 pacientes mostraron una mediana de tiempo de injerto de neutrófilos y plaquetas de 23 días (IC95%, 20-26 días) y 51 días (IC95%, 41-61 días), respectivamente. Para la evaluación de los factores predictivos del injerto de neutrófilos, el análisis univariado de regresión logística binaria mostró una tendencia hacia una asociación entre el CAN y el CAL42 $\geq 300 \times 10^6/L$ (OR, 1.87; IC95%: 1.2-2.2; $P = 0.07$), aunque en el análisis multivariado el CAN no mostró asociación con el CAL42 $\geq 300 \times 10^6/L$ (HR, 1.81, IC95%, 0.87-1.74, P

= 0.20). La mediana del número de células CD3+ infundidas en los pacientes que injertaron en los primeros 42 días después del TSCU fue de $5.7 \times 10^6/\text{kg}$ (rango de $1.8\text{-}53.9 \times 10^6/\text{kg}$, RIC, $3.5\text{-}11.4 \times 10^6/\text{kg}$) y para los pacientes sin evidencia de injerto de neutrófilos en los primeros 42 días tras el TSCU fue de $2.3 \times 10^6/\text{kg}$ (rango, $1.3\text{-}46.3 \times 10^6/\text{kg}$, RIC, $2.6\text{-}10.9 \times 10^6/\text{kg}$).

EICRa y EICRc

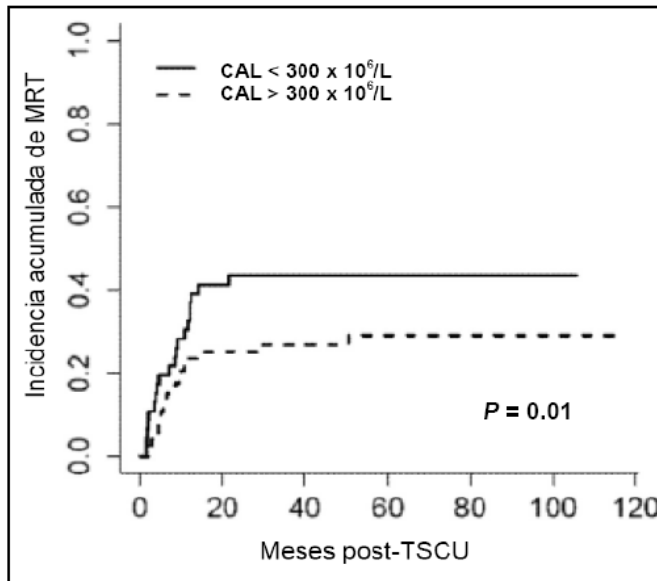
La incidencia acumulada de EICRa grado II-IV fue del 26% (IC95%: 23.7%-29.1%) y de grado III-IV del 5.8% (IC95%: 4.8%-6.5%), con una mediana de tiempo de 23 días (rango, 13-151 días) y 44 días (rango, 13-104 días), respectivamente. Catorce (12%) de los 116 pacientes evaluables desarrollaron EICRc. La mediana de tiempo para el desarrollo de EICRc fue de 126 días (rango, 119-827 días). La incidencia acumulada de EICRc a +5 años fue del 8.3% (IC95%, 8.1%-8.5%) siendo leve en 8 pacientes, moderada en 4 pacientes y severa en 2 pacientes. El análisis multivariado mostró una mayor incidencia de EICRa en pacientes de edad ≥ 20 años (HR, 1.82; IC95% 1.27-2.63; $P = 0.01$) y que recibieron un TASP previo (HR 1.76; IC95% 1.25-2.33; $P = 0.01$), mientras que la incidencia de EICRc fue mayor en hombres (HR, 1.84, IC95%, 1.16- 2.77, $P = 0.02$). El CAL42 no tuvo impacto sobre el desarrollo EICRa ($P = 0.50$) o EICRc ($P = 0.80$).

Recaída

Entre los pacientes diagnosticados de una neoplasia hematológica ($n = 183$), 35 (19%) recayeron tras el TSCU, con una incidencia acumulada de recaída del 26% a +5 años (IC95%, 24.2%-28.1%). La mediana de tiempo hasta la recaída fue de 13.1 meses (rango, 0.8-61 meses). El análisis multivariado mostró una asociación entre el riesgo de recaída y el estado avanzado de la enfermedad previo al TSCU (HR, 1.54; IC 95%, 1.24-1.91; $P = 0.008$). El valor del CAL42 no se asoció con la recaída ($P = 0.20$).

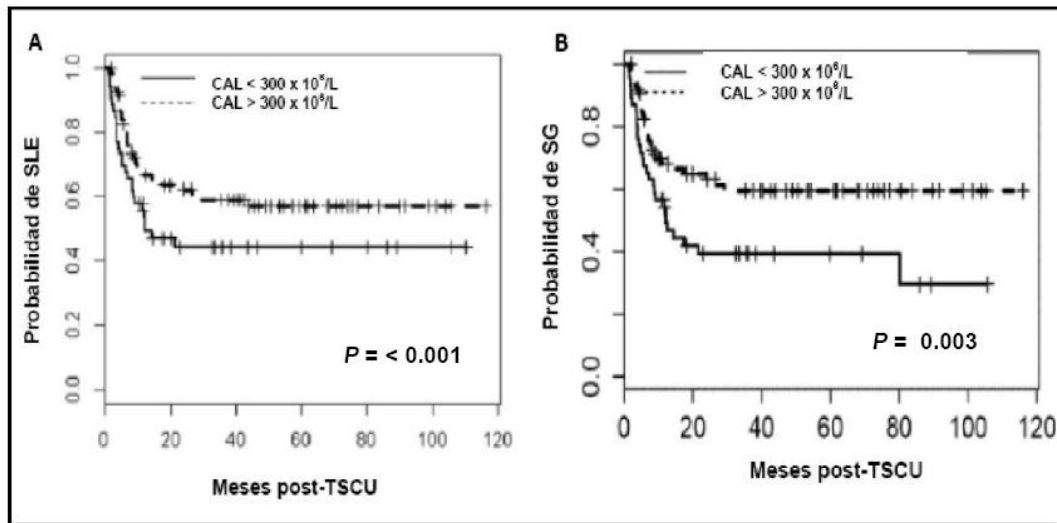
MRT

Un total de 74 pacientes (35%) murieron debido a una causa relacionada con el trasplante. Las complicaciones infecciosas fueron la causa principal de muerte (n = 58; 78%), seguida de EICRa (n = 7; 9%), citopenias autoinmunes (n = 7; 9%) y microangiopatía trombótica asociada al trasplante (n = 2, 3%). La incidencia acumulada de MRT a +5 años fue del 33% (IC95%, 32%-34%). En el análisis multivariado, los factores predictores de MRT fueron: un CAL42 < 300 × 10⁶/L (HR, 1.76; IC95%: 1.34-2.32; *P* = 0.001) y la fase avanzada de la enfermedad (HR, 1.72; CI95%; 1.51-1.81, *P* = 0.006). El impacto del CAL42 sobre la MRT se muestra en la Figura 3. La incidencia acumulada de la MRT por infección oportunista (IO) a +5 años fue del 22% (IC95%, 18.1%-26.2%). En el análisis multivariado, los factores asociados a un aumento significativo del riesgo de MRT por IO fueron: el CAL42 < 300 × 10⁶/L (HR, 1.96; IC95%: 1.2-4.81; *P* < 0.001) y un mayor grado de incompatibilidad del CMH (HR, 1.61; IC95%, 1.2-2.03, *P* = 0.01).

Figura 3. Impacto del CAL $< 300 \times 10^6/L$ ó $\geq 300 \times 10^6/L$ sobre la MRT

Supervivencia

De los 210 pacientes, 110 (52%) se encontraban vivos al final del estudio y 108 se encontraban libres de enfermedad. La probabilidad de SLE y SG a +5 años fue del 48% (IC95%, 40%-58%) y del 52% (IC95%, 44%-62%), respectivamente. Los factores asociados a una mayor probabilidad de SLE y SG en el análisis multivariado fueron un mayor CAL42 (para SLE: HR, 2.03; IC95%, 1.15-3.6; $P < 0.001$; para SG: HR, 2.03; IC95%: 1.17-3.6; $P < 0.001$) y el estado no avanzado de la enfermedad (para SLE: HR, 1.6; IC95%, 1.2-2.16; $P = 0.01$; para SG: HR, 1.6; IC95%: 1.2-2.06; $P = 0.008$). Los efectos del CAL42 sobre la SLE y SG se muestran en la Figura 4.

Figura 4. SG (A) y SLE (B) en relación a CAL42 $< 300 \times 10^6/L$ o $\geq 300 \times 10^6/L$ **Tabla 5.** Análisis de Fine and Gray para los Resultados Globales post-TSCU

Evento	HR	95% IC	P-valor
EICRa			
Pacientes mayores (> 20 años)	1.82	(1.27-2.63)	0.01
TASP previo	1.76	(1.25-2.33)	0.01
EICRc			
Hombre	1.84	(1.16-2.77)	0.02
MRT			
Enfermedad avanzada	1.72	(1.51-1.81)	0.006
CAL42 $< 300 \times 10^6/L$	1.76	(1.34-2.32)	0.001
Mortalidad relacionada con IO			
Compatibilidad CMH	1.61	(1.2-2.03)	0.01
CAL42 $< 300 \times 10^6/L$	1.96	(1.2-4.81)	< 0.001
Recaída			
Fase avanzada	1.54	(1.24-1.91)	0.008
SLE			
Fase precoz-intermedia	1.6	(1.2-2.16)	0.01
CAL42 $\geq 300 \times 10^6/L$	2.03	(1.15-3.6)	< 0.001
SG			
Fase precoz-intermedia	1.6	(1.2-2.06)	0.008
CAL42 $\geq 300 \times 10^6/L$	2.03	(1.17-3.6)	< 0.001

HR indica hazard ratio; IC, intervalo de confianza; EICRa, enfermedad injerto contra receptor aguda, TASP, trasplante autólogo de sangre periférica; EICRc, enfermedad injerto contra receptor crónica; MRT, mortalidad relacionada con el trasplante; IO, infección oportunistas; CAL, conteo absoluto de linfocitos; CMH, complejo mayor de histocompatibilidad; SLE, supervivencia libre de enfermedad; SG, supervivencia global.

Tabla 6. Análisis univariado para el riesgo de recaída, EICRa y EICRc

Variable	Riesgo de recaída		EICRa Grado II-IV		EICRc	
	Incidencia acumulada a +5 años (%)	P-valor	Incidencia acumulada a +100 días (%)	P-valor	Incidencia acumulada a +5 años (%)	P-valor
Año de trasplante						
2005-2009	28	0.06	43	0.4	15	0.9
2010-2014	14		25		16	
Sexo						
Masculino	20	0.4	16	0.3	17	0.1
Femenino	22		11		15	
Edad (años)						
≤ 20	16	0.2	17	0.2	13	0.3
> 20	25		10		23	
TASP previo						
No	18	0.2	18	0.2	14	0.6
Sí	35		16		18	
Diagnóstico						
Enfermedad maligna	37	0.03	21	0.4	7	0.03
Enfermedad no maligna	9		13		23	
Fase de la enfermedad						
Precoz-Intermedia	11	<0.001	18	0.7	19	0.1
Avanzada	39		10		24	

*EICR indica enfermedad injerto contra receptor; TASP, trasplante autólogo de sangre periférica; CMV, citomegalovirus; CNT, células nucleadas totales, CsA, ciclosporina A; PDN, prednisona; MFM, micofenolato de mofetilo; GAT, globulina antitímocítica; CMH, complejo mayor histocompatibilidad; CAL, contaje absoluto linfocitos; TSCU, trasplante de sangre de cordón umbilical. *Continuación adelante.*

Tabla 6 (continuación). Análisis univariado para el riesgo de recaída, EICRa y EICRc

Variable	Riesgo de recaída		EICRa Grado II-IV		EICRc	
	Incidencia acumulada a +5 años (%)	P-valor	Incidencia acumulada a +100 días (%)	P-valor	Incidencia acumulada a +5 años (%)	P-valor
Estado serológico CMV receptor						
Negativo	19	0.5	12	0.8	17	0.8
Positivo	21		15		18	
CNT post-descongelación						
< 2.5 x10 ⁷ /kg	19	0.8	10	0.7	18	0.7
≥ 2.5 x10 ⁷ /kg	23		15		19	
CD34+ post-descongelación						
< 1.3 x10 ⁵ /kg	20	0.6	7	0.08	6	0.01
≥ 1.3 x10 ⁵ /kg	24		20		28	
CD3+ post-descongelación						
< 4 x10 ⁶ /kg	19	0.2	9	0.3	18	0.9
≥ 4 x10 ⁶ /kg	26		17		20	
Profilaxis EICR						
CsA-PDN	27	0.1	8	0.09	19	0.8
CsA-MFM	14		18		18	
Dosis GAT						
≤ 6 mg/kg	13	0.05	20	0.09	21	0.2
> 6 mg/kg	24		11		12	

EICR indica enfermedad injerto contra receptor; TASP, trasplante autólogo de sangre periférica; CMV, citomegalovirus; CNT, células nucleadas totales, CsA, ciclosporina A; PDN, prednisona; MFM, micofenolato de mofetilo; GAT, globulina antitimocítica; CMH, complejo mayor histocompatibilidad; CAL, conteo absoluto linfocitos; TSCU, trasplante de sangre de cordón umbilical. *Continuación adelante.

Tabla 6 (continuación). Análisis univariado para el riesgo de recaída, EICRa y EICR.

Variable	Riesgo de recaída		EICRa Grado II-IV		EICRc	
	Incidencia acumulada a +5 años (%)	P-valor	Incidencia acumulada a +100 días (%)	P-valor	Incidencia acumulada a +5 años (%)	P-valor
Compatibilidad CMH						
4/6 antígenos	21	0.9	12	0.5	22	0.2
5-6/6 antígenos	19		15		16	
CAL a 42 días post-TSCU						
<300 x10 ⁹ /L	18	0.8	12	0.5	17	0.8
≥300 x10 ⁹ /L	21		15		18	
Compatibilidad de sexo						
Varón-Varón	38	0.53	55	0.89	55	0.56
Varón-Mujer	36		52		52	
Mujer-Varon	41		52		52	
Mujer-Mujer	21		52		52	
Compatibilidad grupo ABO						
Mayor	36	0.09	14	0.2	20	0.4
Menor	21		4		22	
No	11		24		6	

EICR indica enfermedad injerto contra receptor; TASP, trasplante autólogo de sangre periférica; CMV, citomegalovirus; CNT, células nucleadas totales, CsA, ciclosporina A; PDN, prednisona; MFM, micofenolato de mofetilo; GAT, globulina antitímocítica; CMH, complejo mayor histocompatibilidad; CAL, conteo absoluto linfocitos; TSCU, trasplante de sangre de cordón umbilical.

Tabla 7. Análisis univariado para la MRT, SLE y SG.

Variable	MRT		Mortalidad relacionada- IO		SLE		SG	
	Incidencia acumulada a +5 años (%)	P-valor	Incidencia acumulada a +5 años (%)	P-valor	Probabilidad a +5 años	P-valor test Log-rank	Probabilidad a +5 años	P-valor test Log-rank
Año de trasplante								
2005-2009	35	0.08	39	0.01	51	0.7	51	0.7
2010-2014	30		14		53		53	
Sexo								
Masculino	39	0.1	26	0.18	35	0.4	51	0.4
Femenino	30		10		38		52	
Edad (años)								
< 20	32	0.7	15	0.2	40	0.3	54	0.4
≥ 20	38		24		32		48	
TASP previo								
No	33	0.1	49	0.9	42	0.07	56	0.03
Sí	49		51		13		28	
Diagnóstico								
Enfermedad maligna	38	0.09	44	0.2	13	0.07	63	0.01
Enfermedad no maligna	16		35		42		46	

MRT indica mortalidad relacionada con el trasplante; IO, infección oportunista; SLE; supervivencia libre de enfermedad; SG, supervivencia global; TASP, trasplante autólogo de sangre periférica; CMV, citomegalovirus; CNT, células nucleadas totales; EICR, enfermedad injerto contra receptor; CsA; ciclosporina A; PDN, prednisona; MFM, micofenolato de mofetilo; GAT, globulina antitímocítica; CMH, complejo mayor histocompatibilidad; CAL, conteo absoluto de linfocitos; TSCU, trasplante de sangre de cordón umbilical. *Continuación adelante.

Tabla 7 (continuación). Análisis univariado para la MRT, SLE y SG

Variable	MRT		Mortalidad relacionada- IO		SLE		SG	
	Incidencia acumulada a +5 años (%)	P-valor	Incidencia acumulada a +5 años (%)	P-valor	Probabilidad a +5 años	P-valor test Log-rank	Probabilidad a +5 años	P-valor test Log-rank
Fase de la enfermedad								
Precoz-Intermedia	26	0.02	15	0.01	45	0.04	57	< 0.001
Avanzada	39		47		15		34	
Estado serológico CMV receptor								
Negativo	25	0.07	11	0.001	31	0.05	62	0.1
Positivo	41		24		47		46	
CNT post-descongelación								
<2.5 x10 ⁷ /kg	40	0.3	40	0.3	45	0.9	50	0.8
≥2.5 x10 ⁷ /kg	33		32		49		51	
CD34+ post-descongelación								
<1.3 x10 ⁵ /kg	38	0.5	41	0.7	37	0.3	45	0.6
≥1.3 x10 ⁵ /kg	31		30		54		52	
CD3+ post-descongelación								
<4 x10 ⁶ /kg	41	0.2	40	0.4	44	0.8	48	0.7
≥4 x10 ⁶ /kg	24		28		50		55	

MRT indica mortalidad relacionada con el trasplante; IO, infección oportunista; SLE; supervivencia libre de enfermedad; SG, supervivencia global; TASP, trasplante autólogo de sangre periférica; CMV, citomegalovirus; CNT, células nucleadas totales; EICR, enfermedad injerto contra receptor; CsA; ciclosporina A; PDN, prednisona; MFM, micofenolato de mofetilo; GAT, globulina antitimocítica; CMH, complejo mayor histocompatibilidad; CAL, contaje absoluto linfocitos; TSCU, trasplante de sangre de cordón umbilical. *Continuación adelante.

Tabla 7 (continuación). Análisis univariado para la MRT, SLE y SG

Variable	MRT		Mortalidad relacionada- IO		SLE		SG	
	Incidencia acumulada a +5 años (%)	P-valor	Incidencia acumulada a +5 años (%)	P-valor	Probabilidad a +5 años	P-valor test Log-rank	Probabilidad a +5 años	P-valor test Log-rank
Profilaxis EICR								
CsAPDN	36	0.7	39	0.9	43	0.6	50	0.8
CsAMMF	34		31		53		54	
Dosis GAT								
≤ 6 mg/kg	28	0.02	39	0.5	50	0.4	55	0.2
> 6 mg/kg	47		32		44		44	
Compatibilidad CMH								
4/6 antígenos	46	0.07	43	0.05	48	0.4	48	0.4
5-6/6 antígenos	33		24		54		57	
Compatibilidad grupo ABO								
Mayor	28	0.1	32	0.05	52	0.6	52	0.6
Menor	37		42		40		44	
No	49		45		48		42	
CAL a 42 días post-TSCU								
<300 x10 ⁹ /L	60	0.01	46	<0.001	44	<0.001	42	0.003
≥300 x10 ⁹ /L	42		17		57		56	

MRT indica mortalidad relacionada con el trasplante; IO, infección oportunista; SLE; supervivencia libre de enfermedad; SG, supervivencia global; TASP, trasplante autólogo de sangre periférica; CMV, citomegalovirus; CNT, células nucleadas totales; EICR, enfermedad injerto contra receptor; CsA; ciclosporina A; PDN, prednisona; MFM, micofenolato de mofetilo; GAT, globulina antitimocítica; CMH, complejo mayor histocompatibilidad; CAL, conteo absoluto de linfocitos; TSCU, trasplante de sangre de cordón umbilical. *Continuación adelante.

Tabla 7 (continuación). Análisis univariado para la MRT, SLE y SG

Variable	MRT		Mortalidad relacionada- IO		SLE		SG	
	Incidencia acumulada a +5 años (%)	P-valor	Incidencia acumulada a +5 años (%)	P-valor	Probabilidad a +5 años	P-valor test Log-rank	Probabilidad a +5 años	P-valor test Log-rank
Compatibilidad de sexo								
Varón-Varón	17		56		27		11	
Varón-Mujer	41	0.01	57	0.6	14	0.48	9	0.9
Mujer-Varon	38		52		17		10	
Mujer-Mujer	19		39		25		11	

MRT indica mortalidad relacionada con el trasplante; IO, infección oportunista; SLE; supervivencia libre de enfermedad; SG, supervivencia global; TASP, trasplante autólogo de sangre periférica; CMV, citomegalovirus; CNT, células nucleadas totales; EICR, enfermedad injerto contra receptor; CsA, ciclosporina A; PDN, prednisona; MFM, micofenolato de mofetilo; GAT, globulina antitímocítica; CMH, complejo mayor histocompatibilidad; CAL, conteo absoluto linfocitos; TSCU, trasplante de sangre de cordón umbilical.

*Los resultados de esta parte del trabajo fueron publicados en forma de artículo en *Biology of Blood and Marrow Transplantation* y a continuación se aporta una copia del trabajo tal y como fue publicado.*



Cord Blood Units with High CD3⁺ Cell Counts Predict Early Lymphocyte Recovery After In Vivo T Cell–Depleted Single Cord Blood Transplantation



Nerea Castillo^{1,*}, Irene García-Cadenas², Cristina Díaz-Heredia³, Rodrigo Martino², Pere Barba⁴, Christelle Ferrà⁵, Carme Canals¹, Izaskun Elorza³, Teresa Olivé³, Isabel Badell⁶, Jorge Sierra², David Valcárcel⁴, Sergio Querol¹

¹ Banc de Sang i Teixits, Barcelona, Spain

² Adult Hematology Department, Hospital Universitari de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

³ Pediatric Hematology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

⁴ Adult Hematology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

⁵ Institut Català d'Oncologia-Badalona, Barcelona, Spain

⁶ Pediatric Hematology Department, Hospital Universitari de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

Article history:

Received 2 November 2015

Accepted 7 March 2016

Key Words:

Lymphocyte recovery
T cell depletion
Umbilical cord blood transplantation

A B S T R A C T

Although high absolute lymphocyte count (ALC) early after transplantation is a simple surrogate for immune reconstitution, few studies to date have established the predictive factors for ALC after umbilical cord blood transplantation (UCBT). We retrospectively studied the factors associated with early lymphocyte recovery and the impact of the ALC on day +42 (ALC42) of $\geq 300 \times 10^6/L$ on outcomes in 210 consecutive pediatric and adult patients (112 males; median age, 15 years; range, 0.3 to 60 years; interquartile range, 4 to 36 years) who underwent myeloablative in vivo T cell–depleted single UCBT between 2005 and 2014 for malignant and nonmalignant disorders. In a logistic multivariate regression model, factors favoring a higher ALC42 were higher infused CD3⁺ cell dose (odds ratio [OR], 2.7; 95% CI, 1.4 to 5.2; $P = .004$), lower antithymocyte globulin dose (OR, 2.3; 95% CI, 1.2 to 4.5; $P = .01$), and better HLA match (OR, 2.1; 95% CI, 1.1 to 4.1; $P = .03$). In multivariate analysis, lower ALC42 was associated with higher nonrelapse mortality (hazard ratio [HR], 1.76; 95% CI, 1.34 to 2.32; $P = .001$), whereas a higher ALC42 was associated with better disease-free survival (HR, 2.03; 95% CI, 1.15 to 3.6; $P < .001$) and overall survival (HR, 2.03; 95% CI, 1.17 to 3.6; $P < .001$). Our study suggests that the selection of better HLA-matched cord blood units containing higher CD3⁺ cell counts and the use of conditioning regimens with lower ATG doses could improve immune reconstitution after UCBT.

© 2016 The American Society for Blood and Marrow Transplantation.

INTRODUCTION

Delays in lymphocyte recovery after umbilical cord blood transplantation (UCBT) are associated with poor outcomes [1,2]. Absolute lymphocyte count (ALC) could be a simple method for monitoring immune reconstitution and already has been identified as a good predictor of outcomes after UCBT [3–5]. Therefore, understanding factors that promote better ALC recovery are of interest for improving outcomes after UCBT.

Early studies have shown a marked delay of lymphocyte recovery after single UCBT [6], especially when low cell

counts are administered. These findings have triggered a practice change to protocols using larger or even multiple cord blood units, leading to recent improvements in immune reconstitution [7,8]. Nonetheless, delayed lymphocyte recovery remains a concern, causing high infection-related mortality (30% to 45%) in the first 6 months after transplantation, especially when an in vivo T-cell depletion strategy is used [9,10]. Interestingly, researchers using conditioning protocols omitting T cell depletion [11,12] found decreased infection-related mortality, suggesting that T cell passengers present in the graft and surviving to infusion could contribute to this lymphocyte recovery [13]. Moreover, in a recent registry analysis including a large number of transplants, Pascal et al. [14] confirmed that the use of antithymocyte globulin (ATG) could be detrimental in a reduced-intensity conditioning setting, especially when

D.V. and S.Q. contributed equally to this work.

Financial disclosure: See Acknowledgments on page 1078.

* Correspondence and reprint requests: Nerea Castillo, MD.

E-mail address: ncastillo@bst.cat (N. Castillo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2016.03.009>

1083-8791/© 2016 The American Society for Blood and Marrow Transplantation.

administered at the end of conditioning. This deleterious effect of ATG on outcomes and the risk of infection has not been confirmed in other settings, however [15].

Various pretransplantation variables have been studied in an effort to identify risk factors for lymphocyte recovery after UCBT under a EUROCORD analysis. Niehues et al. [16] described the positive influence of better HLA matching, high infused total nucleated cell (TNC) dose, younger recipient age, recipient-positive cytomegalovirus (CMV) serology, and the omission of in vivo T cell depletion in children undergoing UCBT. More data are needed to confirm the main risk factors for lymphocyte recovery after transplantation.

To confirm the importance of greater lymphocyte recovery on outcomes after UCBT, we retrospectively analyzed the predictive role of ALC on day +42 (ALC42) and investigated pretransplantation factors associated with accelerated lymphocyte recovery in a cohort of 210 pediatric and adult patients diagnosed with a hematologic malignancy or non-malignancy who underwent myeloablative T cell–depleted single UCBT.

MATERIALS AND METHODS

Patients

A total of 253 patients underwent UCBT in the study hospitals between January 2005 and August 2014. For the purpose of this study, patients who received a second UCBT ($n = 7$), a related UCBT ($n = 14$), confusion of bone marrow with UCBT ($n = 5$), or UCBT with haploidentical third-party CD34⁺ selected cells ($n = 17$) were excluded from the analysis. The study cohort included all 210 patients (110 [52%] pediatric patients and 100 adult patients) who underwent a first single-unit UCBT at Hospital Vall d'Hebron, Hospital de Sant Pau, or Hospital Germans Trias i Pujol, consisting of 3 adult and 2 pediatric transplantation programs.

Enrollment Criteria

All patients with a hematologic or nonhematologic malignancy were eligible for enrollment if there was a lack of a suitable HLA-matched unrelated donor within a reasonable time after a search through international registries and a suitable umbilical cord blood unit (CBU) available, as described below. This research was performed in accordance with local regulatory approval. Patients or their guardians provided written informed consent for inclusion in each transplantation protocol and for data collection in accordance with the Declaration of Helsinki. For all patients included in the analysis, a single UCBT was the first allogeneic hematopoietic cell transplantation received.

Cell Dose Analysis

All CBUs were thawed and washed by centrifugation. An aliquot was removed from the final product for the analysis before the infusion. This sample was processed for measurement of TNC and flow cytometry assessment of graft composition, including CD34⁺ and CD3⁺ cells, by single platform and the corresponding viability by 7-aminoactinomycin using a modified International Society for Hematotherapy and Graft Engineering gating system [17]. For functional assessment of the CBUs, colony-forming unit assays were performed after thawing. All cell processing tests were performed as described previously [18].

Transplantation Procedure and CBU Selection

All patients received myeloablative conditioning before UCBT. The most commonly used protocol, published previously [19], was based on thiotepa (10 mg/kg i.v.), fludarabine (150 mg/m² i.v.), busulfan (9.6 mg/m² i.v.), and in vivo T cell depletion with ATG 6 to 10 mg/kg i.v. ATG was administered on different schedules starting on day -5 or -4, depending on the overall dose administered, and continuing to day -2.

Graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis was based on cyclosporine (CsA) 1.5 mg/kg/12 hours i.v., followed by 3 to 5 mg/kg/12 hours orally when oral intake was possible, with slow tapering starting between day +90 and day +180 if feasible. CsA was combined with a short course of steroids (1 mg/kg/day) from day +14 to +28 or with mycophenolate mofetil (15 mg/kg/day from day -1 to day +30). As supportive care, all patients received post-transplantation granulocyte colony-stimulating factor from day +7 until neutrophil recovery.

For adult patients, the minimum recommended pre-cryopreserved cell counts were TNC $\geq 1.5 \times 10^7$ /kg and CD34⁺ cells $\geq 0.6 \times 10^5$ /kg. A degree of HLA matching between CBU and the recipient of at least 4 of 6 (considering

HLA-A and -B at the antigen level and -DRB1 at the allele level) was required. For pediatric patients with malignant diseases, the minimum pre-cryopreserved cell counts recommended for selection were TNC $\geq 3 \times 10^7$ /kg and CD34⁺ $\geq 1.5 \times 10^5$ /kg for a 4 to 6 of 6 HLA mismatch. For children with nonmalignant diseases, the minimum pre-cryopreserved cell dose recommended was TNC $\geq 5 \times 10^7$ /kg and CD34⁺ $\geq 2 \times 10^5$ /kg for a 5 to 6 of 6 HLA mismatch.

Definitions

Myeloid engraftment

Neutrophil engraftment was defined as the first of 3 consecutive days with an ANC $\geq 0.5 \times 10^9$ /L and transfusion-independent platelets $\geq 20 \times 10^9$ /L for 7 consecutive days, respectively.

Sustained donor engraftment

Engraftment was defined as sustained donor-derived count recovery with full donor chimerism ($\geq 95\%$ donor hematopoiesis). Full donor chimerism was determined by quantitative polymerase chain reaction of informative polymorphic short tandem repeat regions of DNA from donor and recipient using the AmpFISTR Identifier Plus PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Based on a previous report [20], patients who survived ≥ 42 days after transplantation and who failed to achieve myeloid engraftment were considered to have primary graft failure. Secondary graft failure was defined as loss of the engraftment.

Assessment of GVHD, nonrelapse mortality, opportunistic infection–related mortality, relapse, disease-free survival, overall survival, and disease status

Recipients were evaluated weekly for development and grading of acute GVHD (aGVHD). aGVHD and chronic GVHD (cGVHD) were diagnosed and graded according to standard criteria [21–24]. Patients dying before +100 day were not considered for cGVHD analysis. Nonrelapse mortality (NRM) was defined as death from any cause without evidence of relapse. Opportunistic infection (OI)-related mortality was defined as death from a viral, fungal, or protozoal infection. Disease-free survival (DFS) was defined as survival from the time of transplantation without evidence of disease relapse. Overall survival (OS) was defined as survival from the time of transplantation. Disease status at the time of transplantation was classified as follows: early phase: acute leukemia, myelodysplastic syndrome (MDS), and lymphoma in first complete remission, untreated MDS with $<5\%$ blasts, and/or chronic myelogenous leukemia (CML) in the first chronic phase; intermediate phase: acute leukemia, lymphoma, or MDS in a second remission and CML in a second or further chronic or accelerated phase; advanced phase: acute leukemia and lymphoma not in remission, CML in blast crisis, and untreated refractory anemia with excess blasts [25].

Statistical Analysis

Our preliminary exploratory univariate analysis demonstrated a positive association between ALC42 $<300 \times 10^6$ /L after transplantation and worse survival; therefore, we used the ALC value at this time point in our univariate and multivariate analyses. The median ALC42 of the cohort was 345×10^6 /L (<300 versus ≥ 300 used in a cutoff model for analysis; range, 0 to 2800; IQR, 200 to 600). We then evaluated the associations of factors predictive of ALC $\geq 300 \times 10^6$ /L. Patients diagnosed with primary graft failure ($n = 9$), relapse ($n = 1$), or any grade of aGVHD ($n = 18$), and those who died ($n = 14$) before day +42 were excluded from the analysis ($n = 42$), to avoid their influence on ALC42. Binary logistic regression was used for univariate and multivariate analyses to estimate the association of predictive factors of $\geq 300 \times 10^6$ /L. Characteristics selected for inclusion in the multivariate model were those with some indication of association in univariate analysis ($P < .10$). Results were expressed as odds ratio (OR) and corresponding 95% confidence interval (CI).

We then estimated the cumulative incidence for engraftment, NRM, GVHD, and relapse, and also calculated the probability of DFS and OS in the whole cohort. Then we analyzed the risk factors for general outcomes, including ALC42 $\geq 300 \times 10^6$ /L, using a landmark analysis at day +42 in the whole cohort. Cumulative incidence curves were used in a competing-risks setting to calculate the cumulative incidences of neutrophil and platelet engraftment, aGVHD, cGVHD, relapse, and NRM [26]. A Cox proportional hazard model or the Fine and Gray method for competing events was used for multivariate analysis [27]. Death without engraftment was the competing event for neutrophil and platelet engraftment, and death without relapse was the competing event for relapse. Relapse or death without the development of aGVHD or cGVHD was the competing event for aGVHD and cGVHD, respectively. Survival probability was calculated using the Kaplan-Meier estimate [28], and comparisons were made using the log-rank test. Baseline characteristics are reported as median, range, and interquartile range (IQR) for quantitative variables and as frequency and percentages for categorical variables. Characteristics selected for inclusion in

the multivariate model were those with some indication of association in univariate analysis ($P < .10$). All statistical tests were conducted using SPSS version 20.0 (IBM, Armonk, NY). Cumulative incidence with competing risks were analyzed using R version 3.1.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

RESULTS

Patient and CBU Characteristics

Characteristics of the 210 study patients are summarized in Table 1. During the study period, 210 consecutive patients underwent myeloablative single UCBT from an unrelated donor. The median age at transplantation was 15 years (range, 0.3 to 60 years; IQR, 4 to 36 years). The majority of the patients had acute leukemia ($n = 152$; 72%). Among the patients diagnosed with a malignant disease ($n = 183$; 87%), 102 (56%) were in an early disease stage before UCBT, 49 (27%) were in an intermediate disease stage, and 32 (17%) were in an advanced stage. Regarding HLA compatibility, matching was 6 of 6 in 35 patients (17%), 5 of 6 in 90 patients (43%), and 4 of 6 in 85 patients (40%). The median follow-up was 48.3 months (range, 7 to 108 months). According to the foregoing enrollment criteria, a total of 168 patients were evaluable in this study. The median infused TNC, CD34⁺, and CD3⁺ cell counts were $3.4 \times 10^7/\text{kg}$ (range, 0.2 to $26.3 \times 10^7/\text{kg}$; IQR, 2.4 to $6.5 \times 10^7/\text{kg}$), $1.3 \times 10^5/\text{kg}$ (range, 0.1 to $22.7 \times 10^5/\text{kg}$; IQR, 0.9 to $2.4 \times 10^5/\text{kg}$), and $4.2 \times 10^6/\text{kg}$ (range, 0.5 to $89.6 \times 10^6/\text{kg}$; IQR, 3.4 to $11 \times 10^6/\text{kg}$), respectively. Ninety patients (43%) received CBUs with a major ABO blood mismatch.

Risk Factors Associated with Lymphocyte Recovery

For the whole cohort, factors predictive of $\text{ALC42} \geq 300 \times 10^6/\text{L}$ in univariate analysis were nonmalignant disease, early disease status, negative recipient CMV serostatus, neutrophil engraftment at day 42, lower ATG dose, greater HLA mismatch, and higher infused TNC, CD34⁺, and CD3⁺ cell counts (Table 2). In multivariate analysis, higher infused CD3⁺ cell counts (OR, 2.7; 95% CI, 1.4 to 5.2; $P = .004$), lower ATG dose (OR, 2.3; 95% CI, 1.2 to 4.5; $P = .01$), and greater HLA mismatch (OR, 2.1; 95% CI, 1.1 to 4.1; $P = .03$) remained as factors predictive of $\text{ALC42} \geq 300 \times 10^6/\text{L}$ (Table 3). The variables that did not remain significant in multivariate analysis were recipient age (OR, 1.9; 95% CI, 0.4 to 1.71; $P = .26$), sex (OR, 1.8; 95% CI, 0.6 to 1.9; $P = .23$), underlying disease (OR, 2.2; 95% CI, 0.5 to 3.2; $P = .32$), disease status before transplantation (OR, 2.1; 95% CI, 0.42 to 2.4; $P = .34$), previous autologous stem cell transplantation (ASCT) (OR, 3.3; 95% CI, 0.28 to 6.2; $P = .19$), recipient CMV status (OR, 2.5; 95% CI, 0.1 to 4.2; $P = .80$), ABO group incompatibility (OR, 1.9; 95% CI, 0.6 to 3.4; $P = .26$), ANC $\geq 500 \times 10^6/\text{L}$ (OR, 2.06; 95% CI, 0.1 to 4.8; $P = .20$), GVHD prophylaxis (OR, 2.12; 95% CI, 0.5 to 3.8; $P = .20$), TNC dose (OR, 2.43; 95% CI, 0.12 to 3.7; $P = .30$), and CD34⁺ cell dose (OR, 3.1; 95% CI, 0.2 to 4.6; $P = .10$).

General Outcomes and Risk Factors

The results of the multivariate analyses for the various transplantation outcomes are summarized in Table 4. The results of the univariate analyses are provided in Supplementary Data.

Engraftment

Fourteen patients (7%) died before engraftment (median time, 17 days; range, 13 to 25 days) and were not evaluable for this event. Nine of 196 (5%) patients had graft failure. The

Table 1

Patient and Graft Characteristics ($n = 210$)

Characteristic	Value*
Year of transplantation, n (%)	
2005-2009	105 (50)
2010-2014	105 (50)
Sex, n (%)	
Male	112 (53)
Age at transplantation, yr	
Median (range, IQR)	15 (0.3-60, 4-36)
Time from initial diagnosis to transplantation, mo	
Median (range, IQR)	11.5 (0.5-181, 8-14)
Recipient CMV serostatus, n (%)	
Positive	144 (69)
Negative	66 (31)
Conditioning regimen, n (%)	
TT-Flu-Bu-ATG	123 (59)
TT-Flu-Cy-ATG	6 (3)
VP16-Cy-TBI-ATG	34 (16)
Cy-TBI-ATG	3 (1)
Bu-Cy-ATG	12 (6)
Bu-Cy-Mel-ATG	6 (3)
Flu-Mel-ATG	5 (2)
Flu-Cy-ATG	6 (3)
Bu-Cy-Mel-ATG	6 (3)
FLAG-IDA-Mel-ATG	5 (2)
Treosulfan-Cy-ATG	4 (2)
Underlying disease, n (%)	
Malignant	180 (86)
Nonmalignant	30 (14)
Underlying disease, n (%)	
AML	69 (33)
ALL	83 (40)
HL	9 (4)
NHL	5 (2)
MDS	5 (2)
CML	8 (4)
CMML	4 (2)
Immunodeficiency	21 (10)
Metabolic disorders	6 (3)
Disease phase, n (%) [†]	
Early	102 (56)
Intermediate	49 (27)
Advanced	32 (17)
GVHD prophylaxis, n (%)	
CsA-PDN	120 (57)
CsA-MMF	90 (43)
HLA match, n (%) [‡]	
4/6	85 (40)
5/6	90 (43)
6/6	35 (17)
ABO group incompatibility, n (%)	
Major	90 (43)
Minor	50 (24)
None	70 (33)
ATG dose, mg/kg, n (%)	
6	118 (56)
7.5	42 (20)
8	34 (16)
10	16 (8)
Post-thawing TNC dose	
Median (range, IQR)	3.4 (0.2-26.3, 2.4-6.5)
Post-thawing CD34 ⁺ dose	
Median (range, IQR)	1.3 (0.1-22.7, 0.9-2.1)
Post-thawing CD3 ⁺ dose	
Median (range, IQR)	4.2 (0.5-89.6, 3.4-11)

TT indicates thiotepa; Flu, fludarabine; Bu, busulfan; VP16, etoposide; Cy, cyclophosphamide; TBI, total body irradiation; Mel, melphalan; FLAG, fludarabine-AraC-G-CSF; IDA, idarubicin; AML, acute myelogenous leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; HL, Hodgkin lymphoma; NHL, non-Hodgkin lymphoma; CMML, chronic myelomonocytic leukemia; CsA, cyclosporine; PDN, prednisone; MMF, mycophenolate mofetil.

* Percentages might not sum to 100 because of rounding.

[†] Considering only patients diagnosed with a hematologic malignancy.

[‡] Considering HLA-A and -B at the antigen level and -DRB1 at the allele level.

Table 2
Univariate Analysis of Risk Factors Associated with Lymphocyte Recovery According to Patient and Graft Characteristics

Characteristic	OR (95% CI)	P Value
Age		
<20 yr*		
>20 yr	1.44 (0.82–2.53)	.20
Sex		
Male*		
Female	1.12 (0.1–2.18)	.69
Underlying disease		
Nonmalignant		
Malignant*	2.4 (0.98–5.9)	.06
Disease status before transplantation		
Early		
Intermediate-advanced*	1.63 (1.2–2.39)	.04
Previous ASCT		
Yes*		
No	1.12 (1.01–1.22)	.778
Recipient CMV serostatus		
Positive		
Negative*	1.8 (1.49–2.62)	.02
ABO group incompatibility		
None*		
Major		
Minor	0.93 (0.46–1.94)	.48
ANC $>500 \times 10^6/L$		
<42 d post-UCBT*		
>42 d post-UCBT	1.87 (1.2–2.2)	.07
ATG dose		
≤ 6 mg/kg		
>6 mg/kg*	2.9 (1.57–5.03)	<.001
GVHD prophylaxis		
CsA-PDN*		
CsA-MMF	1.47 (0.51–1.61)	.74
HLA mismatch		
4/6*		
5–6/6	2.8 (2.36–3.24)	<.001
Number of post-thawing TNC doses		
<2.5		
$>2.5^*$	2.42 (1.9–2.92)	.004
Number of post-thawing CD34 ⁺ doses		
<1*		
≥ 1	1.67 (0.71–0.96)	.073
Number of post-thawing CD3 ⁺ doses		
<4*		
≥ 4	3.5 (3.1–3.85)	<.001

* Reference category.

remaining 187 patients achieved neutrophil and platelet engraftment at a median of 23 days (95% CI, 20 to 26 days) and 51 days (95% CI, 41 to 61 days), respectively. Indeed, for evaluation of risk factors for neutrophil engraftment, univariate binary logistic regression analysis demonstrated a trend toward an association between ANC and $ALC42 \geq 300 \times 10^6/L$ (OR, 1.87; 95% CI, 1.2 to 2.2; $P = .07$), although in multivariate analysis the ANC did not remain associated with $ALC42 \geq 300 \times 10^6/L$ (HR, 1.81; 95% CI, 0.87 to

Table 3
Multivariate Analysis of Risk Factors Associated with Lymphocyte Recovery according Patient and Graft Characteristics

Characteristic	OR (95% CI)	P Value
HLA mismatch		
4/6*		
5–6/6	2.1 (1.1–4.1)	.03
ATG dose		
≤ 6 mg/kg		
>6 mg/kg*	2.3 (1.2–4.5)	.01
Number of post-thawing CD3 ⁺ doses		
<4*		
≥ 4	2.7 (1.4–5.2)	.004

* Reference category.

Table 4
Fine and Gray Multivariate Analysis for Outcomes

Outcome	HR	95% CI	P Value
aGVHD			
Older patients	1.82	1.27–2.63	.01
Previous ASCT	1.76	1.25–2.33	.01
cGVHD			
Male	1.84	1.16–2.77	.02
NRM			
Advanced disease	1.72	1.51–1.81	.006
$ALC42 < 300 \times 10^6/L$	1.76	1.34–2.32	.001
OI-related mortality			
4/6 HLA match	1.61	1.2–2.03	.01
$ALC42 < 300 \times 10^6/L$	1.96	1.2–4.81	<.001
Relapse			
Advanced disease	1.54	1.24–1.91	.008
DFS			
Early-intermediate disease	1.6	1.2–2.16	.01
$ALC42 > 300 \times 10^6/L$	2.03	1.15–3.6	<.001
OS			
Early-intermediate disease	1.6	1.2–2.06	.008
$ALC42 > 300 \times 10^6/L$	2.03	1.17–3.6	<.001

ALC42 indicates absolute lymphocyte count at day +42.

1.74; $P = .20$). The median number of infused CD3⁺ cells in patients who engrafted within the first 42 days after UCBT was $5.7 \times 10^6/kg$ (range, 1.8 to $53.9 \times 10^6/kg$; IQR, 3.5 to $11.4 \times 10^6/kg$), and that for patients without evidence of neutrophil engraftment within the first 42 days after UCBT was $2.3 \times 10^6/kg$ (range, 1.3 to $46.3 \times 10^6/kg$; IQR, 2.6 to $10.9 \times 10^6/kg$).

aGVHD and cGVHD

The cumulative incidence of grade II to IV aGVHD at day +180 was 26% (95% CI, 23.7% to 29.1%), and that for grade III to IV aGVHD was 5.8% (95% CI, 4.8% to 6.5%) at a median time of 23 days (range, 13 to 151 days) and 44 days (range, 13 to 104 days), respectively. Fourteen (12%) of 116 evaluable patients developed cGVHD. The median time to the development of cGVHD was 126 days (range, 119 to 827 days). The cumulative incidence of cGVHD at 5 years was 8.3% (95% CI, 8.1% to 8.5%) and was mild in 8 patients, moderate in 4 patients, and severe in 2 patients. Multivariate analysis showed a higher incidence of aGVHD in patients age ≥ 20 years (HR, 1.82; 95% CI, 1.27 to 2.63;

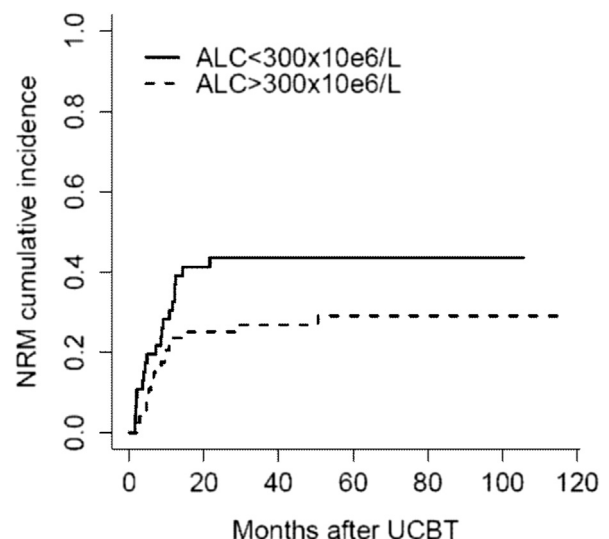


Figure 1. Cumulative incidence of NRM based on ALC42. Impact of $ALC42 \leq 300$ or $>300 \times 10^6/L$.

$P = .01$) and who underwent previous ASCT (HR, 1.76; 95% CI, 1.25 to 2.33; $P = .01$), whereas the incidence of cGVHD was higher in males (HR, 1.84; 95% CI, 1.16 to 2.77; $P = .02$). ALC42 had no impact on aGVHD ($P = .50$) or cGVHD ($P = .80$) events.

Relapse

Among the patients diagnosed with a hematologic malignancy ($n = 183$), 35 (19%) relapsed after UCBT, with a 5-year cumulative incidence of relapse of 26% (95% CI, 24.2% to 28.1%). The median time to relapse was 13.1 months (range, 0.8 to 61 months). Multivariate analysis showed an association between the risk of relapse and advanced disease status before UCBT (HR, 1.54; 95% CI, 1.24 to 1.91; $P = .008$). ALC42 was not a risk factor associated with relapse ($P = .20$).

NRM

A total of 74 patients (35%) died of a transplantation-related cause. Infectious complications were the most frequent main cause of death ($n = 58$; 78%) followed by aGVHD ($n = 7$; 9%), autoimmune cytopenias ($n = 7$; 9%), and thrombotic microangiopathy associated with transplantation ($n = 2$; 3%). The 5-year cumulative incidence of NRM was 33% (95% CI, 32% to 34%). In multivariate analysis, factors associated with a significantly increased risk of NRM were ALC42 $<300 \times 10^6/L$ (HR, 1.76; 95% CI, 1.34 to 2.32; $P = .001$) and advanced disease status (HR, 1.72; 95% CI, 1.51 to 1.81; $P = .006$). The impact of ALC42 on NRM is shown in Figure 1. The 5-year cumulative incidence of OI-related mortality was 22% (95% CI, 18.1% to 26.2%). In multivariate analysis, factors associated with a significantly increased risk of OI-related mortality were ALC42 $<300 \times 10^6/L$ (HR, 1.96; 95% CI, 1.2 to 4.81; $P < .001$) and greater HLA mismatch (HR, 1.61; 95% CI, 1.2 to 2.03; $P = .01$).

Survival

Of the 210 patients, 110 (52%) were alive at the end of the study, and 108 were disease-free. The 5-year probability of OS and DFS of the entire cohort was 48% (95% CI, 40% to 58%) and 52% (95% CI, 44% to 62%), respectively. Factors associated with improved DFS and OS in multivariate analysis were a higher ALC42 (for DFS: HR, 2.03; 95% CI, 1.15 to 3.6; $P < .001$; for OS: HR, 2.03; 95% CI, 1.17 to 3.6; $P < .001$) and nonadvanced disease status (for DFS: HR, 1.6; 95% CI, 1.2 to 2.16; $P = .01$; for OS: HR, 1.6; 95% CI, 1.2 to 2.06; $P = .008$). The effects of ALC42 on DFS and OS are shown in Figure 2.

DISCUSSION

Our findings identify the main factors associated with a higher ALC42 after UCBT as infused CD3⁺ cell dose, ATG dose, and the degree of HLA matching, demonstrating the impact of ALC42 on NRM and survival. We chose to evaluate ALC42 based on previous studies that established a diagnosis of graft failure in patients who had not achieved neutrophil recovery by day +42. Interestingly, we analyzed ALC at days +30 and +60 and found similar results. Although a number of reports have confirmed the influence of ALC on outcomes after UCBT [2,6,29–31], there are minimal published data on predictive factors for lymphocyte recovery after transplantation [16].

The relevance of infused CD3⁺ cell dose further confirms the importance of the post-thymic passenger T cells contained in grafts for immune reconstitution in the UCBT setting. This may be because administering an excess of lymphocytes, especially when *in vivo* T cell depletion is used, would facilitate the persistence of some lymphocyte subsets that accelerate lymphocyte recovery.

Although we did not study the effect of lymphocyte subsets in the grafts, our data are in agreement with other reports of an association between T cell CD8⁺ cell counts in the graft and long-term outcomes after UCBT [32,33]. A comparative analysis of cell subsets in cord blood and adult peripheral blood has revealed phenotypic and functional peculiarities of cord blood cells. This finding focuses attention on cord blood T cell specificities as a key type of cell in UCBT. In this regard, Mold et al. [34] suggested that fetal and adult T cells arise from different populations of hematopoietic stem cells that are present at various stages of development; therefore, cord blood lymphocytes appear to be derived largely from ontogeny, which could confer different properties on transplant biology. Thus, they also may be responsible for some of the differences in clinical features observed after UCBT [35]. We recently evaluated the impact of viable CD45⁺ cell counts on outcomes after UCBT, and attributed the potential effects of infused leukocytes in that effect [18]. Our present data identify T cell fraction as the main mediator of such effects; therefore, strategies that preserve viable T cells linked to the use of better HLA-matched CBUs could be a good balance for accelerating immune reconstitution without increasing the risk of GVHD.

In an effort to improve engraftment and limit GVHD, some groups have used *in vivo* T cell depletion in the conditioning regimen, which is likely associated with delayed T cell recovery [1,14] and could contribute to an increased incidence of OI because of the skewed and limited TCR

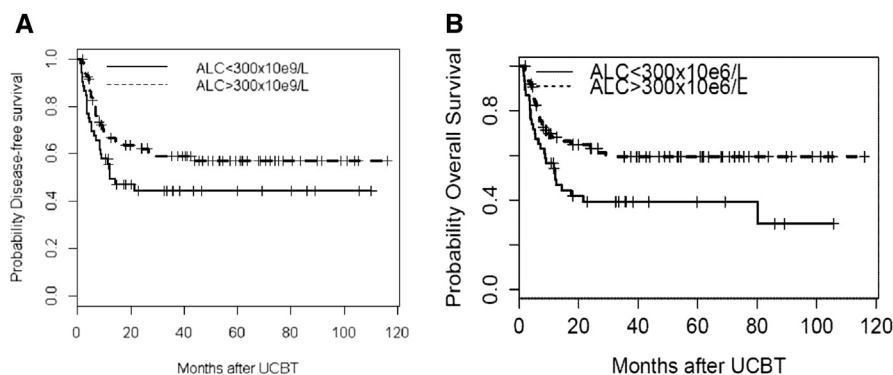


Figure 2. OS (A) and DFS (B) by ALC42. Impact of ALC42 ≤ 300 or $>300 \times 10^6/L$.

repertoire and an inversion of the normal CD4⁺:CD8⁺ ratio. As a direct consequence of delayed lymphocyte recovery, those patients are at high risk for NRM, owing mainly to infections, the main cause of death in the present study. This could explain our results identifying ALC as a risk factor for OI-related mortality. To improve immune reconstitution, omitting ATG from the conditioning regimen has been proposed [11,13]. In this setting, faster lymphocyte recovery was observed, with early expansion of T cells in peripheral blood that resulted in low infection-related mortality and only a moderate increase in the incidence of GVHD. This combination promoted a remarkably high survival [13]. In contrast to other studies, in our cohort the incidence of aGVHD was lower than that seen in recipients of double UCBT [36], a fact that could be explained by a lower infused cell dose and by the effect of ATG in our series. Moreover, the latter factor would explain why we did not observe an association between ALC and aGVHD, in disagreement with previous studies [37]. In myeloablative adult unrelated donor transplantation for hematologic malignancies, ATG has been associated with a lower incidence and severity of cGVHD and reduced late mortality risk. Lindemans et al. [37] reported the results of ATG inclusion in recipients of myeloablative or nonmyeloablative conditioning for malignant and nonmalignant diseases and found that although the probability of severe aGVHD was lower in the ATG-conditioned group, immune reconstitution was delayed and viral reactivation was greater in this group. Despite these results, that study and other studies [38,39] found similar survival in recipients of ATG-containing regimens and recipients of non-ATG-containing regimens. Unfortunately, our series included only patients receiving ATG, and thus we are not able to present data on the impact of the omission of T cell depletion.

We found an association between the degree of HLA matching and lymphocyte recovery that is in concordance with previously published data. Komandura et al. [6] reported a delayed immune reconstitution related to HLA disparity that is common in UCBT. Other groups have shown the independent effect of high-resolution HLA typing on outcomes after UCBT [40], and recent studies have reported better outcomes in UCBT with improved allele-level matching for HLA loci (A-, B-, C-, and -DRB1). Those results suggest the prudence of avoiding UCBT with ≥ 3 allele-level mismatches owing to an unacceptable NRM and inferior survival. Therefore, our data further emphasize the need for better HLA-matched CBUs, similar to other groups [41,42].

Even though our study includes a relatively high number of patients treated with common clinical practices and biological assessment, it still has limitations inherent to retrospective analyses. Despite the wide diversity of underlying diseases and patient age, our results conclusively identify the leading factors affecting lymphocyte recovery after UCBT. Another limitation of this study is the unavailability of lymphocyte subsets, although ALC is clinically easy to determine in a very general way to measure immune reconstitution. Our data confirm the impact of low ALC42 on the major outcomes after T cell-depleted single UCBT. This finding might be of value for therapies with adoptive transfer using lymphocytes based on ex vivo expanded T cord blood immune cells, like specific T cells or donor lymphocyte infusion.

In conclusion, infusion of a high number of CD3⁺ cells, administration of low ATG dose in the conditioning regimen, and the use of better HLA-matched CBUs were the main factors contributing to higher ALC42 values, which affected

both NRM and OS. These findings are of interest in CBU selection, emphasizing the positive interaction between cell counts, especially lymphocytes, and HLA matching in UCBT. Refining CBU selection and the use of new strategies for GVHD prophylaxis that reduce, omit, or modify the timing of ATG infusion are central to improve early immune reconstitution and outcomes after UCBT.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial disclosure: N.C. is supported by a fellowship of Banc de Sang i Teixits and Fundació La Marató de TV3 (File number 20133230). This work has been conducted within the framework of the Doctorate in Medicine of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Conflict of interest statement: There are no conflicts of interest to report.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2016.03.009>.

REFERENCES

- Saliba RM, Rezvani K, Leen A, et al. General and virus-specific immune cell reconstitution after double cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21:1284-1290.
- Burke MJ, Vogel RI, Janardan SK, et al. Early lymphocyte recovery and outcomes after umbilical cord blood transplantation (UCBT) for hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17:831-840.
- Savani BN, Mielke S, Rezvani K, et al. Absolute lymphocyte count on day 30 is a surrogate for robust hematopoietic recovery and strongly predicts outcome after T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13:1216-1223.
- Geyer MB, Jacobson JS, Freedman J, et al. A comparison of immune reconstitution and graft-versus-host disease following myeloablative conditioning versus reduced-toxicity conditioning and umbilical cord blood transplantation in paediatric recipients. *Br J Haematol.* 2011;155:218-234.
- Hamza NS, Lisgaris M, Yadavalli G, et al. Kinetics of myeloid and lymphocyte recovery and infectious complications after unrelated umbilical cord blood versus HLA-matched unrelated donor allogeneic transplantation in adults. *Br J Haematol.* 2004;124:488-498.
- Komanduri KV, St John LS, de Lima M, et al. Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood.* 2007;110:4543-4551.
- Brown JA, Stevenson K, Kim HT, et al. Clearance of CMV viremia and survival after double umbilical cord blood transplantation in adults depends on reconstitution of thymopoiesis. *Blood.* 2010;115:4111-4119.
- Ballen KK, Spitzer TR, Yeap BY, et al. Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13:82-89.
- Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med.* 2004;351:2265-2275.
- Rocha V, Labopin M, Sanz G, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med.* 2004;351:2276-2285.
- Sauter C, Abboud M, Jia X, et al. Serious infection risk and immune recovery after double unit cord blood transplantation without antithymocyte globulin. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17:1460-1471.
- Lucchini G, Perales MA, Vey P. Immune reconstitution after cord blood transplantation: peculiarities, clinical implications and management strategies. *Cytotherapy.* 2015;17:711-722.
- Chiesa R, Gilmour K, Qasim W, et al. Omission of in vivo T-cell depletion promotes rapid expansion of naïve CD4⁺ cord blood lymphocytes and restores adaptive immunity within 2 months after unrelated cord blood transplant. *Br J Haematol.* 2012;156:656-666.
- Pascal L, Tucunduva L, Ruggeri A, et al. Impact of ATG-containing reduced-intensity conditioning after single- or double-unit allogeneic cord blood transplantation. *Blood.* 2015;126:1027-1032.
- Ponce DM, Hilden P, Devlin SM, et al. High disease-free survival with enhanced protection against relapse after double-unit cord blood transplantation when compared with T cell-depleted unrelated donor transplantation in patients with acute leukemia and chronic myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21:1985-1993.

16. Nihues T, Rocha V, Filipovich AH, et al. Factors affecting lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children: a Eurocord analysis. *Br J Haematol*. 2001; 114:42–48.
17. Scaradavou A, Smith KM, Hawke R, et al. Cord blood units with low CD34⁺ cell viability have a low probability of engraftment after double-unit transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16:500–508.
18. Castillo N, García-Cadenas I, Barba P, et al. Post-thaw viable CD45⁺ cells and clonogenic efficiency are associated with better engraftment and outcomes after single cord blood transplantation in adult patients with malignant diseases. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21:2167–2172.
19. Sanz J, Boluda JC, Martín C, et al. Single-unit umbilical cord blood transplantation from unrelated donors in patients with hematological malignancy using busulfan, thiopeta, fludarabine and ATG as myeloablative conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47: 1287–1293.
20. Ruggeri A, Peffault de Latour R, Carmagnat M, et al. Outcomes, infections, and immune reconstitution after double cord blood transplantation in patients with high-risk hematological diseases. *Transpl Infect Dis*. 2011;13:456–465.
21. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974;18:295–304.
22. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant*. 1995;15:825–828.
23. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man: a long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med*. 1980;69:204–217.
24. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease, I: Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11:945–956.
25. Gratwohl A. The EBMT risk score. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47: 749–756.
26. Iacobelli S. Suggestions on the use of statistical methodologies in studies of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(Suppl 1):S1–S37.
27. Fine JP. Regression modeling of competing crude failure probabilities. *Biostatistics*. 2001;2:85–97.
28. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958;53:457–481.
29. Jacobson CA, Turki AT, McDonough SM, et al. Immune reconstitution after double umbilical cord blood stem cell transplantation: comparison with unrelated peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18:565–574.
30. Somers JA, Brand A, van Hensbergen Y, et al. Double umbilical cord blood transplantation: a study of early engraftment kinetics in leukocyte subsets using HLA-specific monoclonal antibodies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19:266–273.
31. Tedeschi SK, Jagasia M, Engelhardt BG, et al. Early lymphocyte reconstitution is associated with improved transplant outcome after cord blood transplantation. *Cytotherapy*. 2011;13:78–82.
32. Terakura S, Azuma E, Murata M, et al. Hematopoietic engraftment in recipients of unrelated donor umbilical cord blood is affected by the CD34⁺ and CD8⁺ cell doses. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13: 822–830.
33. Moscardó F, Sanz J, Carbonell F, et al. Effect of CD8⁺ cell content on umbilical cord blood transplantation in adults with hematological malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20:1744–1750.
34. Mold JE, Venkatasubrahmanyam S, Burt TD, et al. Fetal and adult hematopoietic stem cells give rise to distinct T cell lineages in humans. *Science*. 2010;330:1695–1699.
35. Danby R, Rocha V. Improving engraftment and immune reconstitution in umbilical cord blood transplantation. *Front Immunol*. 2014;5:68.
36. Ponce CM, Gonzales A, Lubin M, et al. Graft-versus-host disease after double-unit cord blood transplantation has unique features and an association with engrafting unit-to-recipient HLA match. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19:904–911.
37. Gul Z, Van Meter E, Abidi M, et al. Low blood lymphocyte count at 30 days post-transplant predicts worse acute GVHD and survival but not relapse in a large retrospective cohort. *Bone Marrow Transplant*. 2015; 50:432–437.
38. Lindemans CA, Chiesa R, Amrolia PJ, et al. Impact of thymoglobulin prior to pediatric unrelated umbilical cord blood transplantation on immune reconstitution and clinical outcome. *Blood*. 2014;123:126–132.
39. Ponce DM, Eapen M, Sparapani R, et al. In vivo T cell depletion with myeloablative regimens on outcomes after cord blood transplantation for acute lymphoblastic leukemia in children. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21:2173–2179.
40. Terakura S, Atsuta Y, Tsukada N, et al. Comparison of outcomes of 8/8 and 7/8 allele-matched unrelated bone marrow transplantation and single-unit cord blood transplantation in adults with acute leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22:330–338.
41. Oran B, Cao K, Saliba RM, et al. Better allele-level matching improves transplant-related mortality after double cord blood transplantation. *Haematologica*. 2015;100:1361–1370.
42. Eapen M, Klein JP, Ruggeri A, et al. Impact of allele-level HLA matching on outcomes after myeloablative single unit umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancy. *Blood*. 2014;123: 133–140.

2-Estudio cinético de la reconstitución de las diferentes subpoblaciones linfocitarias y los factores asociados a su recuperación tras el TSCU en pacientes con neoplasias hematológicas y enfermedades no neoplásicas.

RESUMEN

Este trabajo se realizó con la intención de describir el patrón de recuperación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos y encontrar los factores predictivos de ésta tras el trasplante de sangre de cordón umbilical (TSCU).

En este estudio se incluyeron 225 pacientes pediátricos y adultos (122 niños y 103 adultos), con una edad mediana de 15 años y un seguimiento mediano de 49.3 meses.

Teniendo en cuenta a todos los pacientes, la mediana de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ se encontró dentro del rango de normalidad a partir de 18 y 24 meses post-TSCU, respectivamente. Por el contrario, los linfocitos B y linfocitos NK se encontraban dentro del rango de normalidad desde los primeros meses post-TSCU. Cabe destacar la alta frecuencia de infecciones oportunistas a corto y largo plazo tras el TSCU, siendo la primera causa de muerte en esta cohorte.

Los factores predictivos de obtener un conteo de linfocitos T CD4 + $\geq 200 \times 10^6/L$ fueron: una menor dosis de globulina antitimocítica (GAT) administrada, presentar una serología negativa de CMV en el receptor pre-TSCU y una menor edad del receptor. Nuestros resultados demuestran el impacto negativo de la GAT en la recuperación de linfocitos T y sugieren que la reducción u omisión de la GAT podría mejorar la reconstitución inmune (RI) linfocitaria y tal vez reducir las infecciones oportunistas tras el TSCU.

JUSTIFICACIÓN

Con el trabajo previo demostramos algunos factores predictivos de la reconstitución inmune (RI) en términos de contaje absoluto de linfocitos (CAL). Además, cabe destacar que el valor del linfocitos totales que utilizamos como valor de corte, demostró tener impacto sobre algunos resultados globales del trasplante de sangre de cordón umbilical (TSCU) como la mortalidad relacionada con trasplante (MRT) o la supervivencia.

El trabajo anterior tuvo en cuenta el CAL, sin tener en cuenta las diferentes subpoblaciones linfocitarias. En el trabajo actual analizamos la cinética de RI de manera detallada en cada una de las subpoblaciones hasta un periodo tardío post-TSCU, tanto en la población global como por separado en niños y adultos respectivamente. Además, en este trabajo hemos estudiado los factores predictivos de cada una de las subpoblaciones linfocitarias.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

En este estudio fueron incluidos un total de 271 pacientes que recibieron un TSCU entre enero de 2005 y abril de 2015. Se excluyeron los pacientes que recibieron un segundo Alo-TPH (n = 7), un TSCU de donante emparentado (n = 18), co-infusión de médula ósea y TSCU (n = 6) o un TSCU junto con células CD34+ haploidénticas seleccionadas de un donante auxiliar (n = 15). En definitiva se incluyeron un total de 225 [121 (54%) pacientes pediátricos y 104 adultos] que recibieron un TSCU con una única unidad de SCU en el Hospital Vall d'Hebron (Barcelona), Hospital de Sant Pau (Barcelona) e ICO-Hospital Germans Trias i Pujol (Barcelona) que incluyen 3 programas de trasplante en adultos y 2 en pediatría.

Criterios de inclusión

Todos los pacientes con enfermedades malignas hematológicas y enfermedades no hematológicas fueron elegibles para la inclusión en el estudio ya que no disponían de un donante adecuado con compatibilidad del CMH dentro de un tiempo razonable tras la búsqueda a través de los registros internacionales y disponían de una unidad de SCU adecuada, como se describe a continuación. Los pacientes o sus tutores dieron su consentimiento informado por escrito para la inclusión en cada protocolo de trasplante. Todos los pacientes incluidos en el análisis recibieron un TSCU como primer Alo-TPH.

Procedimiento del trasplante y selección de la unidad de SCU

Todos los pacientes recibieron un acondicionamiento mieloablativo. El protocolo más utilizado fue publicado previamente (*Sanz J, 2012*) y está basado en tiotepa (10 mg/kg iv), fludarabina (150 mg/m² iv), busulfán (9.6 mg/m² iv) y depleción de células T *in vivo* con globulina antitimocítica [(GAT) 6 a 10 mg/kg iv, Thymoglobulin®, Sangstat/Genzyme, Lyon, France]. La GAT se administró en diferentes días a partir del día -5 ó -4 al -2 dependiendo de la dosis global administrada.

La profilaxis de la enfermedad injerto contra el receptor (EICR) consistió en ciclosporina [CsA (1.5 mg mg/kg/12 horas iv seguido de 3 a 5 mg/kg/12 horas por vía oral)] cuando la ingesta oral fue posible y posteriormente se realizó una disminución lenta de dosis entre los días +90 y +180 si era factible. La CsA se combinó con una tanda corta de corticoides (1 mg/kg/día) del día +14 a +28 o micofenolato mofetilo (MFM, 15 mg/kg/d del día -1 al día +30). Como tratamiento de soporte, todos los pacientes recibieron factor estimulante de colonias de granulocitos desde el día +7 hasta la recuperación de neutrófilos.

Para los pacientes adultos, el recuento mínimo de células criopreservadas recomendado fue CNT $\geq 1.5 \times 10^7$ /kg y células CD34+ $\geq 0.6 \times 10^5$ /kg. Se requirió un grado de compatibilidad del CMH entre la unidad de SCU y el

receptor $\geq 4/6$ (considerando CMH-A y -B al nivel antigénico y -DRB1 a nivel alélico). Para los pacientes pediátricos con enfermedades malignas, el recuento mínimo de células criopreservadas recomendado fue de CNT $\geq 3 \times 10^7/\text{kg}$ y de CD34+ $\geq 1.5 \times 10^5/\text{kg}$ para grados de compatibilidad del CMH de 4/6 a 6/6. Para los niños con enfermedades no malignas, la dosis mínima de células criopreservadas recomendada fue de CNT $\geq 5 \times 10^7/\text{kg}$ y de CD34 + $\geq 2 \times 10^5/\text{kg}$ para un grado de compatibilidad de 5/6 y 6/6.

Definiciones

Evaluación de la enfermedad de injerto contra receptor, mortalidad relacionada con el trasplante, recaída, supervivencia libre de enfermedad, supervivencia global y estado de la enfermedad

Los receptores fueron evaluados semanalmente para el desarrollo y la clasificación de la EICR aguda (EICRa). La EICRa y la EICR crónica (EICRc) fueron diagnosticadas y clasificadas de acuerdo con los criterios estándar (*Glucksberg H, 1974; Przepiorka D, 1995*). Los pacientes que fallecieron antes del día +100 no fueron considerados para el análisis de EICRc. La mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) se definió como la muerte por cualquier causa sin evidencia de recaída. La supervivencia libre de enfermedad (SLE) se definió como la supervivencia desde el momento del trasplante sin evidencia de recaída de la enfermedad. La supervivencia global (SG) se definió como la supervivencia desde el momento del trasplante. El estado de la enfermedad en el momento del trasplante se clasificó de la siguiente manera: (1) fase temprana: leucemia aguda, síndrome mielodisplásico (SMD) y linfoma en primera remisión completa, SMD con $<5\%$ de blastos sin tratar y/o leucemia mieloide crónica (LMC) en primera fase crónica; (2) fase intermedia: leucemia aguda, linfoma o SMD en segunda remisión completa y LMC en segunda o más fases crónicas o aceleradas y (3) fase avanzada: leucemia aguda y linfoma no en remisión, LMC en crisis blástica y anemia refractaria con exceso de blastos no tratada (*Gratwohl A, 2011*).

Definición de Infecciones

Se consideraron las infecciones desde el día de la infusión de progenitores hematopoyéticos (día 0) hasta 24 meses después del trasplante en todos los centros participantes de acuerdo con criterios predefinidos previamente (*van Burik JA, 2007*).

Análisis de sangre periférica por citometría de flujo

La tipificación por inmunofenotipo se realizó en muestras de sangre total obtenidas en los +3, +6, +12, +18 y +24 meses post-trasplante. Se realizó la cuantificación de las siguientes subpoblaciones: número absoluto de linfocitos T (CD3+), linfocitos T *helper* (CD3+ CD4+), linfocitos T citotóxicos (CD3+ CD8+), linfocitos B (CD19+) y linfocitos NK (CD3-CD16+ CD56+) y se determinaron utilizando inmunofluorescencia de 4 colores y análisis de células activadas por fluorescencia. En resumen, se añadió un volumen de 10 µL de reactivo CD3-FITC, CD45-PerCP, CD19-APC o CD3-FITC, CD8-PE, CD45-PerCP, CD4-APC (Perfect-Count, Cytognos, Salamanca), en un tubo que contenía una cantidad conocida de microesferas, seguido de 25 µL de sangre total tratada con EDTA y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los glóbulos rojos fueron lisados posteriormente durante 15 minutos con 450 µL de FACS Lysing Solution (Cytognos). Las muestras se adquirieron usando el FACSCalibur y se analizaron con el software Multiset (Beckman-Dickinson).

Cinética de Recuperación de Linfocitos y Evaluación de Factores Predictivos

Se estudió la cinética de recuperación de linfocitos calculando la mediana y rango de linfocitos T CD3+, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos B y linfocitos NK medidos a los +3, +6, +12, +18 y +24 meses tras el TSCU en cada grupo de edad (<20 y ≥20 años) y en toda la población y comparamos los

resultados con nuestro valor de referencia. También se calculó la mediana de tiempo para alcanzar algunos recuentos de linfocitos debido a su importancia clínica según un estudio previo (*Rénard C, 2011*): el tiempo para alcanzar un recuento de linfocitos T CD3+ ≥ 500 células/ μ L, linfocitos T CD3+ ≥ 1500 células/ μ L, linfocitos T CD4+ ≥ 50 células/ μ L y linfocitos T CD4+ ≥ 200 células/ μ L. Para evaluar el efecto potencial de la GAT en la recuperación de linfocitos T durante el período posterior al trasplante, se calculó la mediana y el rango de linfocitos T CD4+ y CD8+ a los +3 y +6 meses tras el TSCU en los pacientes que no recibieron GAT en el régimen de acondicionamiento.

Las variables pre-trasplante estudiadas por su posible impacto en la recuperación de linfocitos fueron: el año de trasplante, la edad del receptor, el tipo de enfermedad, la fase de la enfermedad, el haber recibido un trasplante autólogo de sangre periférica (TASP) antes del TSCU, la serología del citomegalovirus (CMV), la dosis de CNT, la dosis de células CD34+ infundidas, la dosis de células CD3+ infundidas, las unidades formadoras de colonias (UFC) infundidas, la dosis de GAT pre-trasplante y la profilaxis de EICR.

Análisis estadístico

Las características basales fueron analizadas como mediana, rango y rango intercuartílico (RIC) para las variables cuantitativas y frecuencia y porcentajes para las variables categóricas. La cinética de recuperación de los linfocitos se describió como mediana y rango para cada subpoblación de linfocitos (linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos B y linfocitos NK) en diferentes tiempos (+3, +6, +12, +18, +24 meses) tras el trasplante por edades (≤ 20 y > 20 años) y en toda la población. Además, se calculó la mediana y el intervalo de tiempo para alcanzar los diferentes valores de linfocitos anteriormente descritos en los pacientes en riesgo en el momento del análisis.

Se realizó un análisis univariante para evaluar los factores que influyen en la recuperación de linfocitos. Las características seleccionadas para su inclusión en el modelo multivariado fueron los que mostraron una $P < 0.1$ en el análisis

univariado. Se utilizaron las curvas de incidencia acumulada con riesgos competitivos para calcular la incidencia acumulada del injerto de neutrófilos y plaquetas, EICRa, EICRc, recaída y MRT para toda la población (Ray RJ, 1988). La muerte sin mostrar injerto fue el evento competitivo para el injerto de neutrófilos y plaquetas. La muerte sin recaída fue el evento competitivo de la recaída. La recaída o muerte sin desarrollar EICRa o EICRc fue el evento competitivo para la EICRa y EICRc, respectivamente. La probabilidad de supervivencia en toda la población se calculó utilizando la estimación de Kaplan-Meier (Kaplan EL, 1958). Para realizar el análisis multivariado se utilizó el modelo de riesgo proporcional de Cox o el método de *Fine and Grey* para eventos competitivos (Fine JP GR). Todos los tests estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico SPSS (SPSS versión 20.0, Chicago, IL). La incidencia acumulada con riesgos competitivos se llevó a cabo con el software R, versión 3.1.1 (El proyecto CRAN).

RESULTADOS

Características de los pacientes y de la sangre del cordón umbilical

En el estudio fueron incluidos un total de 225 pacientes. Las características clínicas se resumen en la Tabla 8. Durante el período de estudio, 225 pacientes consecutivos recibieron un TSCU con acondicionamiento mieloablativo de un DNE. La edad mediana en el momento del trasplante fue de 15 años (rango, 0.3-60, RIC, 4-35). La mayoría de los pacientes tenían una leucemia aguda (n= 157, 70%). Entre los pacientes diagnosticados de enfermedades malignas (n= 190, 84%), 104 (55%) se encontraban en fase precoz, 54 (28%) en fase intermedia y 32 (17%) en fase avanzada de la enfermedad previo al TSCU. En cuanto al grado de compatibilidad del CMH, las unidades de SCU fueron 4/6 (n = 86, 38%), 5/6 (n = 98, 44%) y 6/6 (n = 41, 18%). Los pacientes recibieron diferentes dosis de GAT: ninguna (n = 14, 6%), 6 mg/kg (n = 115, 51%), 7.5 mg/kg (n = 43, 19%), 8 mg/kg, 15%) y 10 mg/kg (n = 20, 9%) según el tipo de enfermedad subyacente (maligna o no maligna) y el riesgo de recaída.

Posteriormente, esta variable se dicotomizó en dosis de GAT ≤ 6 mg/kg y > 6 mg/kg para realizar el análisis de los factores predictivos de la reconstitución de linfocitos.

La mediana de seguimiento de los supervivientes fue de 49.3 meses (rango: 12.1 a 67). Las medianas de los recuentos de CNT, CD34+ y CD3+ infundidas fueron de 3.47×10^7 /kg (rango, 0.5-26.3, RIC, 2.46-6.5), 1.35×10^5 /kg (rango, 0.1-22.7, RIC, 0.9-2.26) y 5.2×10^6 /kg (rango, 0.5-89, RIC, 4-11), respectivamente. Cuarenta y ocho (21%) pacientes recibieron unidades de SCU con incompatibilidad del grupo ABO.

Tabla 8. Características de los Pacientes y unidades de SCU (N = 225)

Característica	N (%) ^a
Edad	
≤ 20 años	122
> 20 años	103
Mediana de edad al trasplante, años (rango, RIC)	15 (0.3-60, 4-35)
Mediana de peso al trasplante, años (rango, RIC)	48 (3-117, 16-70)
Sexo, n (%)	126 (56)
Hombre	
Año de trasplante, n (%)	
2005-2009	104
2010-2015	121
TASP previo	29 (23)
Diagnóstico, n (%)	
LLA	87 (39)
LMA	70 (31)
LMC	8 (4)
SMD	7 (3)
LNH	6 (2)
LH	9 (4)
NMP	3 (1)
AAS	4 (2)
Metabolopatía	8 (4)
Inmnodeficiencia	2(10)

*Continuación adelante.

Tabla 8 (continuación). Características de los Pacientes, unidades de SCU (N = 225)

Característica	N (%) ^a
Fase de la enfermedad ^b , n (%)	
Precoz	104 (55)
Intermedia	54 (28)
Avanzada	34 (17)
Acondicionamiento, n (%)	
TT-FLU-BU-GAT	144 (64)
VP16-CY-ICT-GAT	36 (16)
CY-ICT-GAT	6 (3)
BU-CY-GAT	13 (6)
Otros ^c	26 (11)
Profilaxis EICR, n (%)	
CsA-PDN	138 (61)
CsA-MFM	87 (39)
Receptor CMV seropositivo, n (%)	150 (67)
Receptor EBV seropositivo, n (%)	166 (74)
Dosis GAT, n (%)	
No GAT	14 (6)
6 mg/kg	115 (51)
7.5 mg/kg	43 (19)
8 mg/kg	33 (15)
10 mg/kg	20 (9)
Compatibilidad CMH-A antígeno, -B antígeno, -DRB1 alélico, n (%)	
4/6	86 (38)
5/6	98 (44)
6/6	41 (18)
Mediana (rango, RIC) de dosis de CNT x 10 ⁷ /kg post-descongelación	3.47 (0.5-26.3, 2.46-6.5)
Mediana (rango, RIC) de dosis de CD34+ x 10 ⁵ /kg post-descongelación	1.35 (0.1-22.7, 0.9-2.26)
Mediana (rango, RIC) de dosis de CD3+ x 10 ⁴ /kg post-descongelación	5.2 (0.5-89, 3.4-11)

RIC indica rango intercuartílico; TASP, trasplante autólogo de sangre periférica; TT, tiotepa; FLU, fludarabina; BU, busulfán; GAT, globulina antitumoral; CMH, complejo mayor de histocompatibilidad; CNT, células nucleadas totales; VP16, etopósido; CY, ciclofosfamida; ICT, irradiación corporal total; MEL, melfalán; FLAG, fludarabina-AraC-G-CSF (FEC-G); IDA, idarrubicina; EICR, enfermedad injerto contra receptor; CsA, ciclosporina; PDN, prednisona; MFM, micofenolato de mofetilo; CMV, citomegalovirus; EBV, virus de Epstein-Barr. ^aLa suma de porcentajes no es 100 ya que se ha redondeado ^bSólo se consideran pacientes diagnosticados de neoplasias malignas hematológicas. ^cOtros acondicionamientos incluye BU-CY-MEL-GAT (n = 7), FLAG-IDA-MEL-GAT (n = 7), FLAG-IDA-MEL-GAT (n = 7), FLU-BU-GAT (n = 8), Treosulfan-CY-

GAT (n = 4). Las unidades de SCU fueron seleccionadas originalmente según la dosis celular y la compatibilidad del CMH de los antígenos CMH-A y -B y CMH-DRB1 alelos sin tener en cuenta CMH-C y -DQ en el algoritmo de selección.

Resultados globales

La incidencia acumulada de injerto en el día +42 fue del 83% (intervalo de confianza [IC] 95%, 83-85%) y 20 (9%) pacientes mostraron fallo de implante primario. La mediana de tiempo de injerto de neutrófilos y plaquetas $\geq 20 \times 10^9/L$ fue de 22 días (rango, 12-58 días) y 39 días (15-182 días), respectivamente. La incidencia acumulada de EICRa grado II-IV en el día +180 fue del 19.6% (IC95%, 14.2%-22.4%). En el día +180, 24 de los 158 pacientes evaluables (15%) tenían EICRa tardía u *overlap syndrome*. La incidencia acumulada de EICRc a +5 años fue de 8.1% (IC95%, 7.6-9.1). La incidencia acumulada de MRT a +5 años fue del 32% (IC 95%, 30.8%-33.6%). La probabilidad a +5 años de SLE y SG a +5 años de toda la cohorte fue del 49% (IC95%, 40%-58%) y 53% (IC95%, 44%-62%), respectivamente. Las principales causas de muerte fueron las infecciones (n = 60), la recaída (n = 26), la EICRa (n = 6), el fallo de implante primario (n = 3) y otros (n = 8).

Cinética de recuperación de linfocitos

La mediana de tiempo para alcanzar los diferentes valores de linfocitos se muestra en la Tabla 9. El valor de la mediana del CAL de 674 células/ μL (rango 200-2300 células/ μL) fue inferior al valor de rango de referencia de laboratorio (1200-3400 células/ μL) en el mes +3 tras el trasplante.

Tabla 9. Mediana de tiempo de la Reconstitución Inmune de cada Subpoblación Linfocitaria tras el TSCU

Contaje de cada subpoblación linfocitaria	Pacientes en riesgo	Mediana de tiempo (meses)	Rango, RIC (meses)
CAL \geq 300 células/ μ L	188	6.7	(1.9-19.6, 5.3-8.1)
Linfocitos T CD3+ \geq 500/ μ L	141	5.8	(0.5-23.5, 7.2-15.4)
Linfocitos T CD3+ \geq 1500/ μ L	106	13.3	(3.3-53.2, 15.8-36.4)
Linfocitos T CD4+ \geq 50/ μ L	172	4.6	(0.9-6.1, 2.7-11.8)
Linfocitos T CD4+ \geq 200/ μ L	144	10.9	(3.7-14.5, 4.9-13.3)
Linfocitos T CD4+ \geq 500/ μ L	146	14.3	(4.6-35.6, 6.1-16.7)
Linfocitos T CD8+ \geq 200/ μ L	135	18.2	(2.1-26, 3.8-22)
Linfocitos B \geq 200/ μ L	157	2.5	(1.2-6.6, 1.4-5.9)
Linfocitos NK \geq 100/ μ L	179	0.9	(0.8-6.1, 1.3-5.8)

RIC indica rango intercuartílico; CAL, contaje absoluto de linfocitos; NK, natural killer.

Reconstitución de linfocitos T

La mediana del recuento de linfocitos T CD3+ fue de 151 células/ μ L (rango, 0-621 células/ μ L) a +6 meses y 358 (0-1781 células/ μ L) a +12 meses tras el trasplante y encontrándose por debajo del valor del intervalo de referencia (900-4500 células/ μ L). Cabe destacar que la mediana del recuento de linfocitos T CD4+ fue de 59 células / μ L (rango, 0-399 células/ μ L) y 115 células/ μ L (rango, 0-1266 células/ μ L) en el mes +6 y +12 tras el trasplante, respectivamente. Además, la mediana de tiempo para alcanzar una cifra de linfocitos T CD4+ \geq 200 células/ μ L y \geq 500 células/ μ L fue de 10.9 meses (rango 3.7-14.5, RIC 4.9-13.3) y 14.3 meses (rango 4.6-35.6, RIC 6.1-16.7), respectivamente. De forma similar, la mediana del recuento de linfocitos T CD8+ de 74 células/ μ L (rango 0-890 células/ μ L) en el mes +12 se encontraba por debajo del valor del rango normal (0.3-1.6 células/ μ L). La mediana de tiempo, rango y RIC para alcanzar linfocitos T CD8+ \geq 200 células/ μ L fue de 18.2 meses (rango 2.1-26, RIC 3.8-22). La cinética de recuperación de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ en los primeros 24 meses tras el TSCU por grupos de edad y en la población total se

muestran en las Figuras 1 y 2, respectivamente. Se observó una mejor recuperación de linfocitos en todas las subpoblaciones en niños que en adultos. La RI de linfocitos T aumentó considerablemente tanto en los pacientes adultos como pediátricos a partir del mes +12 tras el trasplante, especialmente los linfocitos T CD4+, siendo mayor en la población pediátrica.

Curiosamente, en los 14 pacientes que no recibieron GAT en el régimen de acondicionamiento, la mediana del recuento de linfocitos T CD4+ fue de 83 células/ μ L (rango: 63-98 células/ μ L) y 249 células/ μ L (rango: 168-398 células/ μ L) al mes +3 y +6 tras el TSCU, respectivamente. En estos pacientes, la mediana del recuento de linfocitos T CD8+ fue de 79 células/ μ L (22-105 células/ μ L) y 161 células/ μ L (101-189 células/ μ L) en el mes +3 y +6 tras el TSCU, respectivamente.

Reconstitución de células B y NK

La recuperación de linfocitos B fue más rápida que la recuperación de linfocitos T. La mediana de 314 células/ μ L (rango, 0-1722, RIC 0-754) a los +3 meses se encontró dentro del rango normal (200-2100 células/ μ L) y se mantuvo elevada aumentando progresivamente durante los 24 meses tras el trasplante. La mediana del recuento de linfocitos NK fue de 288 células/ μ L (rango, 0-1552, RIC 221-776) a los +3 meses y también se encontraba dentro del valor del rango normal (100-1000 células/ μ L) permaneciendo constantemente elevado durante los 3 primeros meses y aumentando a los 6 meses post-TSCU. La cinética de recuperación de los linfocitos B y NK fue similar en niños y adultos. La recuperación de los linfocitos B y NK por edades y en toda la población se muestra en las Figuras 5 y 6.

Figura 5. Mediana de linfocitos T CD4+ (A), linfocitos T CD8+ (B), linfocitos B (C) y linfocitos NK (D) tras el TSCU de por edades (niños y adultos)

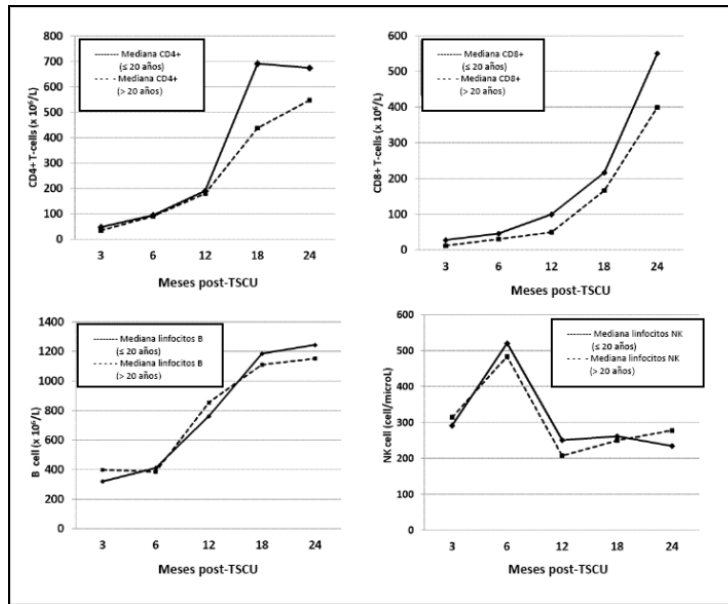
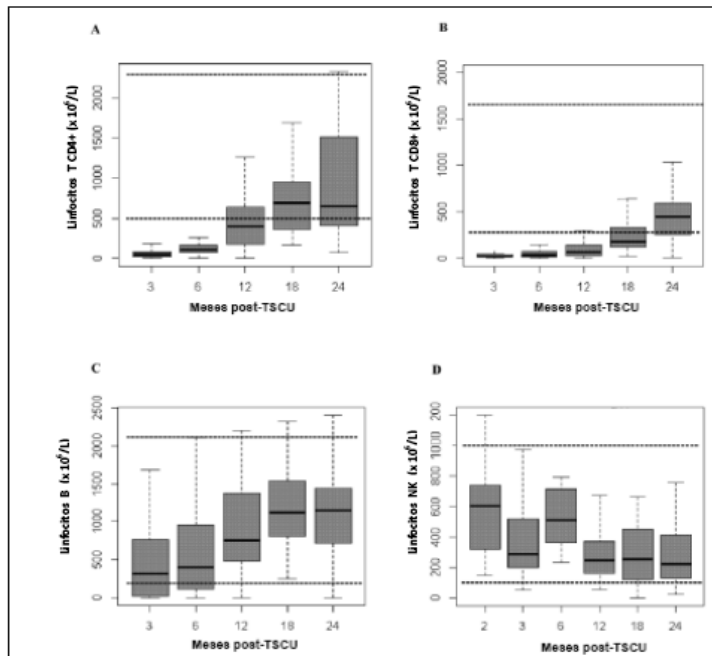


Figura 6. Reconstitución de linfocitos T CD4+ (A), reconstitución de linfocitos T CD8+ (B), reconstitución de linfocitos B (C), reconstitución de linfocitos NK (D) tras el TSCU



*Los diagramas de caja representan el rango intercuartílico y las líneas continuas dentro de las cajas representan el valor de la mediana. Las líneas horizontales representan el rango del valor normal.

Factores de Riesgo para la Reconstitución Inmune

En el análisis multivariado (Tabla 10), el tiempo para alcanzar una cifra de linfocitos T CD3+ \geq 500 células/ μ L se vio influida favorablemente por una dosis menor de GAT [HR = 2.8 (IC 95%: 1.81-5.02), $P = 0.02$] y el estado serológico del CMV del receptor [HR = 2.1 (IC95%: 1.31-4.87), $P = 0.01$]. El tiempo necesario para alcanzar una cifra de linfocitos T CD4 + \geq 200 células/ μ L estuvo influida favorablemente por una dosis menor de GAT [HR = 3.76 (IC95%, 2.3-5.83), $P = 0.001$], IC95%: 1.9-5.74), $P = 0.001$] y la edad del receptor [HR = 2.61 (IC95%: 1.01-3.47), $P = 0.03$]. La dosis menor de GAT y el estado serológico negativo de CMV del receptor previo al TSCU fueron los factores que favorecieron la recuperación de linfocitos T CD8+ \geq 200 células/ μ L [HR = 3.03 (IC95%: 1.4-5.1), $P = 0.03$] y [HR = 1.9 -2.15), $P = 0.01$], respectivamente. El factor con impacto favorable del hecho de alcanzar una cifra de linfocitos B \geq 200 células/ μ L fue el estado serológico negativo del CMV del receptor [HR = 3.47 (IC95%: 1.3-4.25), $P = 0.03$]. Los factores favorables para alcanzar unos valores de linfocitos NK \geq 100 células/ μ L fueron el estado serológico negativo del CMV del receptor [HR = 2.3 (IC95%: 1.03-3.7), $P = 0.03$] y una mayor dosis de linfocitos T CD3 + infundida [HR = 2.8), $P = 0.04$]. En cuanto a la toda la población, el análisis univariado de los factores asociados a alcanzar los diferentes valores de linfocitos se muestran en las Tablas 11 y 12.

Tabla 10. Análisis Multivariado para la Recuperación de Linfocitos

Subpoblación de Linfocitos	HR	IC95%	P-valor
Linfocitos T CD3+ ≥ 500 cél/μL			
Dosis GAT ≤ 6 mg/kg > 6 mg/kg	2.8 1	1.81-5.02	0.02
Estado serológico CMV del receptor Positivo Negativo	1 2.1	1.31-4.87	0.01
Linfocitos T CD3+ ≥ 1500 cél/μL			
Estado serológico CMV del receptor Positivo Negativo	1 2.3	1.81-3.01	0.01
Edad receptor ≤ 20 años > 20 años	2.02 1	1.01-3.41	0.03
Linfocitos T CD4+ ≥ 200 cél/μL			
Estado serológico CMV del receptor Positivo Negativo	1 3.76	1.9-5.74	0.001
Edad receptor ≤ 20 años > 20 años	2.61 1	1.01-3.47	0.03
Dosis GAT ≤ 6 mg/kg > 6 mg/kg	3.93 1	2.3-5.83	0.001
Linfocitos T CD4+ ≥ 500 cél/μL			
Estado serológico CMV del receptor Positivo Negativo	1 1.87	1.1-2.8	0.04
Linfocitos T CD8+ ≥ 200 cél/μL			
Dosis GAT ≤ 6 mg/kg > 6 mg/kg	3.03 1	1.4-5.1	0.03
Estado serológico CMV del receptor Positivo Negativo	1 1.9	1.63-2.15	0.01

Tabla 10 (continuación). Análisis Multivariado para la Recuperación de Linfocitos

Subpoblación de Linfocitos	HR	IC95%	P-valor
Linfocitos B \geq 200 cél/μL			
Estado serológico CMV del receptor	1		
Positivo	3.47	1.3-4.25	0.03
Negativo			
Linfocitos NK \geq 100 cél/μL			
Estado serológico CMV del receptor	1		
Positivo	2.3	1.03-3.7	0.03
Negativo			
Dosis linfocitos T CD3+ infundida	1		
$<4 \times 10^6$ /kg	1.8	1.1-2.8	0.04
$\geq 4 \times 10^6$ /kg			

HR indica hazard ratio; IC, intervalo de confianza; CMV, citomegalovirus; GAT, globulina antitímocítica.

Complicaciones Infecciosas

La frecuencia y el tipo de infecciones graves en relación con cada período de tiempo post-TSCU se muestra en la Figura 7. Ciento ochenta y seis pacientes (83%) sufrieron una o más infecciones en los primeros 30 días tras el TSCU, el 67% de los pacientes sufrieron una o más infecciones entre el día +31 y el +100, el 54% sufrió una o más infecciones entre los días +101 y +180, el 38% sufrió una infección o más entre los días +181 y +365, el 33% sufrió una o más infecciones entre los días +366 y +540 y el 15% sufrió una o más infecciones entre los días +541 y +730. Un total de 60 pacientes fallecieron debido a una infección y 6 episodios de infección contribuyeron a la muerte como causa principal asociadas a un fallo de implante (n = 2) y EICR (n = 4). Las infecciones letales ocurrieron durante un amplio período de tiempo, desde el día +13 al +872 tras el TSCU y 6 de ellas ocurrieron en el primer año después del trasplante. De hecho, después del día +180, las infecciones graves continuaron siendo frecuentes, causadas principalmente por infecciones virales (73%).

Figura 7. Frecuencia del tipo de Infecciones Graves por Periodo de Tiempo tras los Primeros 2 años post-TSCU

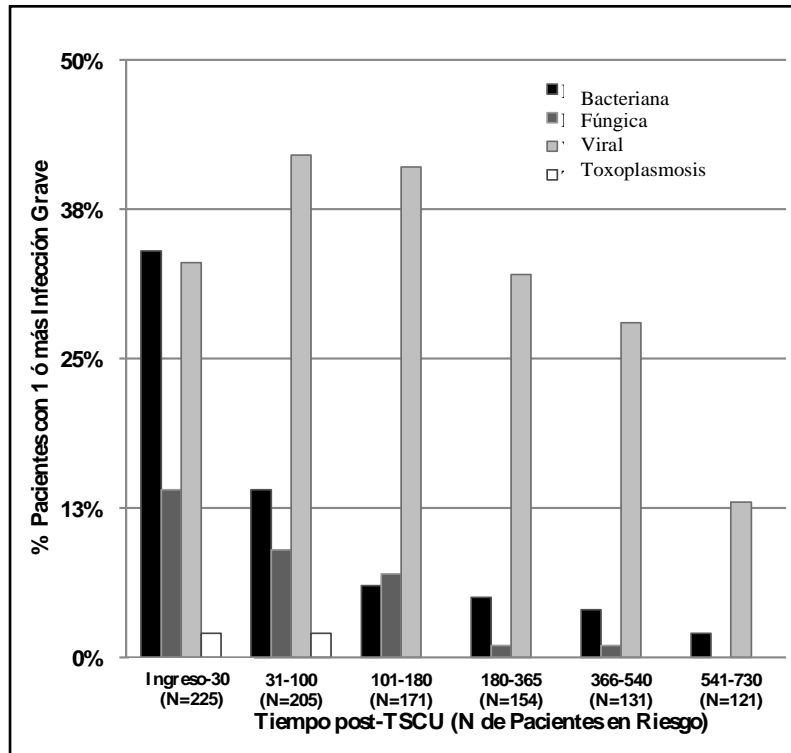


Tabla 11. Análisis Univariado de los Factores Predictores de la Recuperación de Subpoblaciones Linfocitarias

Variable	CD3+ ≥ 500 cél/μL				CD3+ ≥ 1500 cél/μL				CD4+ ≥ 50 cél/μL		CD4+ ≥ 200 cél/μL				CD4+ ≥ 500 cél/μL			
	IA 6m	IA 12m	IA 24m	P-valor	IA 6m	IA12m	IA 24m	P-valor	IA 3m	P-valor	IA 6m	IA 12m	IA 24m	P-valor	IA 6m	IA 12m	IA 24m	P-valor
Año de trasplante 2005-2009 2009-2015	26 30	42 46	46 49	0.7	24 43	32 45	34 45	0.06	7 12	0.2	10 21	26 34	30 34	0.3	10 14	15 34	20 40	0.002
Edad receptor ≤20 años >20 años	31 25	52 34	54 38	0.03	45 27	50 30	50 31	0.01	12 7	0.05	21 13	35 21	34 25	0.02	10 15	24 35	24 36	0.07
Tipo enfermedad Maligna No-maligna	25 42	40 65	42 71	0.03	33 56	36 64	37 64	0.01	6 10	0.3	14 22	28 37	31 37	0.4	11 18	23 28	29 31	0.6
Fase de la enfermedad Precoz Intermedia-avanzada	30 19	47 30	52 32	0.009	35 30	33 40	41 53	0.001	10 4	0.001	15 10	32 23	26 35	0.001	10 22	17 38	25 39	0.01
TASP previo al TSCU Sí No	24 29	39 46	34 49	0.3	30 37	30 42	43 51	0.3	11 19	0.1	15 25	22 32	23 32	0.09	11 17	23 27	28 39	0.2
Serostatus CMV receptor Positivo Negativo	35 42	42 50	43 57	0.003	34 42	39 44	40 52	0.01	7 18	0.002	11 23	22 33	34 42	<0.001	12 23	21 39	28 42	0.001
Compatibilidad CMH 4/6 antígenos 5-6/6 antígenos	25 29	32 41	36 43	0.2	28 33	28 40	30 42	0.2	12 15	0.2	15 20	29 34	31 36	0.3	10 20	23 34	26 35	0.7
Compatibilidad CMH 2-5 de 10 alelos 6-8 de 10 alelos 9-10 de 10 alelos	22 32 46	24 34 46	26 38 46	0.3	21 29 35	26 32 39	26 33 40	0.7	11 17 21	0.3	16 18 26	15 27 30	18 29 33	0.2	4 13 16	13 28 30	18 33 33	0.3

*IA indica incidencia acumulada y está expresada en meses; TASP, trasplante autólogo de sangre periférica; TSCU, trasplante de sangre de cordón umbilical; CMV, citomegalovirus; CMH, complejo mayor de histocompatibilidad; CNT, células nucleadas totales; UFC, unidades formadoras de colonias; GAT, globulina antitímocítica; EICR, enfermedad injerto contra receptor; CsA, ciclosporina; MFM, micofenolato mofetilo; PDN, prednisona.

Tabla 11 (continuación). Análisis Univariado de los Factores Predictores de la Recuperación de Subpoblaciones Linfocitarias

Variable	CD3+ ≥ 500 cél/μL				CD3+ ≥ 1500 cél/μL				CD4+ ≥ 50 cél/μL		CD4+ ≥ 200 cél/μL				CD4+ ≥ 500 cél/μL			
	IA 6m	IA 12m	IA 24m	P-valor	IA 6m	IA12m	IA 24m	P-valor	IA 3m	P-valor	IA 6m	IA 12m	IA 24m	P-valor	IA 6m	IA 12m	IA 24m	P-valor
Dosis CNT <2 x 10 ⁷ /kg ≥2 x 10 ⁷ /kg	25 32	41 42	41 46	0.7	25 32	41 42	41 46	0.7	8 12	0.7	10 17	29 32	32 32	0.9	11 12	22 29	28 33	0.5
Dosis CD34+ <1 x 10 ⁶ /kg ≥1 x 10 ⁶ /kg	26 27	39 42	42 46	0.6	27 39	32 42	34 42	0.3	9 10	0.6	15 15	25 30	27 32	0.5	9 14	23 38	25 28	0.8
Dosis CD3+ <4 x 10 ⁶ /kg ≥4 x 10 ⁶ /kg	22 28	37 45	40 49	0.04	26 41	30 46	30 46	0.09	9 19	0.1	12 26	27 36	28 37	0.06	11 18	23 30	25 33	0.05
Dosis UFC <4 x 10 ⁴ /kg ≥4 x 10 ⁴ /kg	34 34	42 44	42 44	0.8	32 40	38 43	38 43	0.5	10 12	0.5	14 16	28 32	32 33	0.8	8 12	18 26	26 32	0.3
Dosis GAT ≤ 6 mg/kg > 6 mg/kg	30 25	47 40	51 41	0.01	42 27	46 31	47 32	0.02	20 2	< 0.001	11 21	26 37	26 37	0.001	10 23	21 39	28 42	0.01
Profilaxis EICR CsA-MFM CsA-PDN	29 21	45 39	48 42	0.04	39 32	42 36	46 36	0.02	10 21	0.02	14 28	19 30	23 31	0.03	13 25	24 39	25 40	0.04

*IA indica incidencia acumulada y está expresada en meses; TASP, trasplante autólogo de sangre periférica; TSCU, trasplante de sangre de cordón umbilical; CMV, citomegalovirus; CMH, complejo mayor de histocompatibilidad; CNT, células nucleadas totales; UFC, unidades formadoras de colonias; GAT, globulina antitimocítica; EICR, enfermedad del injerto contra receptor; CsA, ciclosporina; MFM, micofenolato mofetilo; PDN, prednisona.

Tabla 12. Análisis Univariado de los Factores Predictores de la Recuperación de Subpoblaciones Linfocitarias

Variable	CD8+ ≥ 200 cél/μL				B cél ≥ 200 cell/μL				NK ≥ 100 cél/μL			
	IA 6m	IA 12m	IA 24m	P-valor	IA 6m	IA 12m	IA 24m	P-valor	IA 6m	IA 12m	IA 24m	P-valor
Año de trasplante 2005-2009 2009-2015	17 31	25 34	36 45	0.01	32 47	32 47	32 47	0.06	50 56	50 56	50 56	0.3
Edad receptor ≤20 años >20 años	17 20	27 30	29 30	0.8	39 38	39 38	39 38	0.9	54 51	54 51	54 51	0.7
Tipo enfermedad Maligna No-maligna	19 28	27 34	28 37	0.2	36 50	36 50	36 50	0.1	48 76	48 76	48 76	0.004
Fase de la enfermedad Precoz Intermedia-avanzada	24 8	35 17	36 18	0.004	43 29	43 29	43 29	0.01	37 59	37 59	37 59	0.05
TASP previo al TSCU Sí No	10 19	20 29	24 30	0.4	31 40	31 40	31 40	0.3	53 58	53 58	53 58	0.8
Serostatus CMV receptor Positivo Negativo	16 31	26 35	27 36	0.002	32 42	32 42	32 42	0.02	42 54	42 54	42 54	0.01
Compatibilidad CMH antigénico 4/6 antígenos 5-6/6 antígenos	9 20	23 34	26 35	0.1	32 42	32 42	32 42	0.1	13 23	13 23	13 23	0.1

*IA indica incidencia acumulada y está expresada en meses; TASP, trasplante autólogo de sangre periférica; TSCU, trasplante de sangre de cordón umbilical; CMV, citomegalovirus; CMH, complejo mayor de histocompatibilidad; CNT, células nucleadas totales; UFC, unidades formadoras de colonias; GAT, globulina antitumoral; EICR, enfermedad injerto contra receptor; CsA, ciclosporina; MFM, micofenolato mofetilo; PDN, prednisona.

Tabla 12 (continuación). Análisis Univariado de los Factores Predictores de la Recuperación de Subpoblaciones Linfocitarias

Variable	CD8+ ≥ 200 cél/μL				B cél ≥ 200 cell/μL				NK ≥ 100 cél/μL			
	IA 6m	IA 12m	IA 24m	P-valor	IA 6m	IA 12m	IA 24m	P-valor	IA 6m	IA 12m	IA 24m	P-valor
Compatibilidad CMH alélico												
2-5 de 10 alélos	14	18	20		20	20	20		31	31	31	
6-8 de 10 alélos	20	22	36	0.2	26	26	26	0.7	40	40	40	0.2
9-10 de 10 alélos	28	30	40		30	30	30		48	48	48	
Dosis CNT												
<2 x 10 ⁷ /kg	16	22	22	0.4	35	35	35	0.5	35	35	35	0.06
≥2 x 10 ⁷ /kg	17	28	30		40	40	40		36	36	36	
Dosis CD34+												
<1 x 10 ⁵ /kg	13	25	27	0.6	32	32	32	0.2	44	44	44	0.2
≥1 x 10 ⁵ /kg	22	29	28		41	41	41		56	56	56	
Dosis CD3+												
<4 x 10 ⁶ /kg	15	23	23	0.07	37	37	37	0.03	43	43	43	0.04
≥4x 10 ⁶ /kg	25	32	33		47	47	47		59	59	59	
Dosis UFC												
<4 x 10 ⁴ /kg	15	27	29	0.7	40	40	40	0.7	47	47	47	0.01
≥4 x 10 ⁴ /kgUFC	20	29	30		42	42	42		64	64	64	
Dosis GAT												
≤ 6 mg/kg	20	33	34	0.01	42	42	42	0.03	60	60	60	0.02
≥ 6 mg/kg	12	25	27		33	33	33		41	41	41	
Profilaxis EICR												
CsA-MFM	18	36	39	0.03	46	46	46	0.07	57	57	57	0.08
CsA-PDN	17	22	23		34	34	34		49	49	49	

*IA indica incidencia acumulada y está expresada en meses; TASP, trasplante autólogo de sangre periférica; TSCU, trasplante de sangre de cordón umbilical; CMV, citomegalovirus; CMH, complejo mayor de histocompatibilidad; CNT, células nucleadas totales; UFC, unidades formadoras de colonias; GAT, globulina antitimocítica; EICR, enfermedad injerto contra receptor; CsA, ciclosporina; MFM, micofenolato mofetilo; PDN, prednisona.

*Los resultados de esta parte del trabajo fueron publicados en forma de artículo en *Biology of Blood and Marrow Transplantation* y a continuación se aporta una copia del trabajo tal y como fue publicado.*



Biology of Blood and Marrow Transplantation

journal homepage: www.bbmt.org



Early and Long-Term Impaired T Lymphocyte Immune Reconstitution after Cord Blood Transplantation with Antithymocyte Globulin

Nerea Castillo ^{1,*}, Irene García-Cadenas ², Pere Barba ³, Carme Canals ¹, Cristina Díaz-Heredia ⁴, Rodrigo Martino ², Christelle Ferrà ⁵, Isabel Badell ⁶, Izaskun Elorza ⁴, Jorge Sierra ², David Valcárcel ³, Sergio Querol ¹

¹ Banc de Sang i Teixits, Barcelona, Spain

² Adult Hematology Department, Hospital Universitari de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

³ Adult Hematology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

⁴ Pediatric Hematology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

⁵ Adult Hematology Department, Institut Català d'Oncologia-Badalona, Barcelona, Spain

⁶ Pediatric Hematology Department, Hospital Universitari de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

Article history:

Received 19 September 2016

Accepted 16 November 2016

Key Words:

Lymphocyte recovery
Antithymocyte globulin
Umbilical cord blood
transplantation

A B S T R A C T

Immune reconstitution is crucial to the success of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Umbilical cord blood transplantation (UCBT) has been associated with delayed immune reconstitution. We characterized the kinetics and investigated the risk variables affecting recovery of the main lymphocyte subsets in 225 consecutive pediatric and adult patients (males, $n = 126$; median age, 15; range, .3 to 60; interquartile range, 4 to 35) who underwent myeloablative single UCBT between 2005 and 2015 for malignant and non-malignant disorders. Low CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts were observed up to 12 months after UCBT. In contrast, B and natural killer cells recovered rapidly early after transplantation. In a multivariate regression model, factors favoring CD4⁺ T cell recovery ≥ 200 cells/ μ L were lower dose antithymocyte globulin (ATG) (hazard ratio [HR], 3.93; 95% confidence interval [CI], 2.3 to 5.83; $P = .001$), negative recipient cytomegalovirus (CMV) serostatus (HR, 3.76; 95% CI, 1.9 to 5.74; $P = .001$), and younger age (HR, 2.61; 95% CI, 1.01 to 3.47; $P = .03$). Factors favoring CD8⁺ T cell recovery ≥ 200 cells/ μ L were lower dose ATG (HR, 3.03; 95% CI, 1.4 to 5.1; $P = .03$) and negative recipient CMV serostatus (HR, 1.9; 95% CI, 1.63 to 2.15; $P = .01$). Our results demonstrate the significant negative impact of ATG on lymphocyte recovery. A reduction of the dose or omission of ATG could improve immune reconstitution and perhaps reduce opportunistic infections after UCBT.

© 2016 American Society for Blood and Marrow Transplantation.

INTRODUCTION

Umbilical cord blood transplantation (UCBT) is commonly used for patients with hematological and nonhematological malignancies who require allogeneic (allo) hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), when there are no HLA-matched donors available.

A major limitation for the use of UCBT is the relatively small number of infused hematopoietic stem cells that results in delayed engraftment [1,2]. Previous studies have shown that T cell recovery is often delayed after UCBT [3-5]. In contrast, B and natural killer (NK) cell appear to recover rapidly after UCBT [6]. Of note, major outcomes after transplantation improve in patients with a rapid T cell recovery [7,8].

Initial cellular immune reconstitution after transplantation largely depends on thymic-independent peripheral expansion of donor-derived memory T cells. After that, thymic-dependent maturation is important for diversification of the T cell repertoire and consolidating host immune reconstitution against pathogens or recurrence of malignancy [9,10].

Previous studies demonstrated that post-transplantation immune recovery is affected by several factors, including thymic involution associated to patient age, the conditioning regimen, HLA disparity between donor and recipient, occurrence of graft-versus-host disease (GVHD), and drugs used to prevent or treat GVHD, such as antithymocyte globulin (ATG) [11-21].

Various groups evaluated the lymphocyte kinetics after UCBT and confirmed a delay in T cell subsets' recovery up to 6 months after transplantation; however, by 12 months,

* Correspondence and reprint requests: Nerea Castillo, MD, Banc de Sang i Teixits, Passeig del Taulat, 106, 08005, Barcelona, Spain.

E-mail address: ncastillo@bst.cat (N. Castillo).

immune recovery is often at least on par with that seen after conventional HSCT. However, despite this, there are limited data on factors involved in lymphocyte subsets' recovery after UCBT [6,9].

Consequently, to understand the key factors influencing lymphocyte recovery after UCBT, we retrospectively explored the main lymphocyte subset kinetics profile and analyzed the predictive factors associated with a prompt lymphocyte recovery in a cohort of 225 pediatric and adult patients diagnosed with neoplastic and non-neoplastic hematological diseases who underwent myeloablative single unit UCBT (sUCBT) using a very consistent selection criteria and conditioning protocol.

MATERIALS AND METHODS

Patient Cohort

A total of 271 patients received an UCBT from January 2005 to April 2015. For the purpose of the study, we excluded patients who received a second allo-HSCT (n = 7), a related UCBT (n = 18), coinfusion of bone marrow with UCBT (n = 6), or UCBT with haploidentical third-party CD34⁺ selected cells (n = 15). We included all 225 (121 [54%] pediatric and 104 adult) patients who received a first sUCBT in the Hospital Vall d'Hebron (Barcelona), Hospital de Sant Pau (Barcelona), and Hospital Germans Trias i Pujol (Barcelona), consisting of 3 adult and 2 pediatric transplantation programs.

Enrollment Criteria

All patients with hematological malignancies and nonhematological diseases were eligible for enrollment if there were a lack of a suitable HLA-matched unrelated donor within a reasonable time after the search through international registries and there was a suitable umbilical cord blood unit (CBU) available, as described below. Patients or their guardians gave written informed consent for their inclusion in each transplantation protocol. For all patients included in the analysis, the sUCBT was the first allo-HSCT received.

Transplantation Procedure and CBU Selection

All patients received myeloablative conditioning. The most commonly used protocol has been previously published [22] and was based on thiopeta (10 mg/kg i.v.), fludarabine (150 mg/m² i.v.), busulfan (9.6 mg/m² i.v.), and in vivo T cell depletion with ATG, 6 to 10 mg/kg i.v. (Thymoglobulin, Sangstat/Genzyme, Lyon, France). ATG was administered in different schedules starting on day -5 or -4 to -2 day depending on the overall dose administered.

GVHD prophylaxis was based on cyclosporine, 1.5 mg/kg/12 hours i.v. followed by 3 to 5 mg/kg/12 hours orally when oral intake was possible and slow tapering starting between day +90 and +180 if feasible. Cyclosporine was combined with a short-course of steroids (1 mg/kg/day) from day +14 to +28 or mycophenolate mofetil (15 mg/kg/day from -1 to +30 day). As supportive care, all patients received post-transplantation granulocyte colony-stimulating factor from day +7 until neutrophil recovery.

For adult patients, the minimum precryopreserved cell counts recommended was total nucleated cells (TNC) > 1.5 × 10⁷/kg and CD34⁺ cells ≥ .6 × 10⁵/kg. A degree of HLA matching between CBU and the recipient greater or equal to 4 of 6 (considering HLA-A and -B at antigen level and -DRB1 at allele level) was required. For pediatric patients with malignant diseases, the minimum precryopreserved cell counts recommended for selection was TNC ≥ 3 × 10⁷/kg and CD34⁺ ≥ 1.5 × 10⁵/kg for 4/6 to 6/6 degree HLA mismatch. For children with nonmalignant diseases, the minimum precryopreserved cell dose recommended was TNC ≥ 5 × 10⁷/kg and CD34⁺ ≥ 2 × 10⁵/kg for 5/6 to 6/6 degree HLA mismatch.

Definitions

Assessment of GVHD, nonrelapse mortality, relapse, disease-free survival, overall survival, and disease status

Recipients were evaluated weekly for development and grading of acute GVHD (aGVHD). Acute and chronic GVHD (cGVHD) were diagnosed and graded according to the standard criteria [23,24]. Patients dying before +100 day were not considered for cGVHD analysis. *Nonrelapse mortality* (NRM) was defined as death from any cause without evidence of relapse. *Disease-free survival* was defined as survival from the time of transplantation without evidence of disease relapse. *Overall survival* was defined as survival from the time of transplantation. Disease status at the time of transplantation was classified as follows: (1) early phase, including acute leukemia, myelodysplastic syndrome (MDS) and lymphoma on the first complete remission, untreated MDS with < 5% blasts and/or chronic myeloid leukemia (CML) in the first chronic phase; (2) intermediate phase, including acute leu-

kemia, lymphoma, or MDS in a second remission and CML in a second or further chronic or accelerated phase; and (3) advanced phase, including acute leukemia and lymphoma not in remission, CML in blast crisis, and untreated refractory anemia with excess blasts [25].

Flow cytometry analysis of peripheral blood

Immunophenotyping was performed on whole-blood samples generally obtained at 3, 6, 12, 18, and 24 months after transplantation. Quantification of the following subsets was performed: absolute number of T cells (CD3⁺), helper T cells (CD3⁺CD4⁺), cytotoxic T cells (CD3⁺CD8⁺), B cells (CD19⁺), and NK cells (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) and were determined using 4-color immunofluorescence and fluorescence-activated cell sorting analysis. Briefly, a volume of 10 μL of CD3-FITC, CD45-PerCP, CD19-APC or CD3-FITC, CD8-PE, CD45-PerCP, CD4-APC reagent (Perfect count, Cytognos, Salamanca, Spain) was added to a tube containing a known quantity of beads, followed by 25 μL of EDTA-treated whole blood and incubated for 15 minutes at room temperature. Red blood cells were subsequently lysed for 15 minutes with 450 μL of FACS Lysing Solution (Cytognos). Samples were acquired using FACSCalibur and analyzed with Multiset software (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

Kinetics of lymphocyte recovery and risk factors assessment

Lymphocyte recovery kinetics were studied calculating the median and range of CD3⁺ T cell, CD4⁺ T cell, CD8⁺ T cell, B, and NK cells measured at 3, 6, 12, 18, and 24 months after UCBT by age (<20 and ≥20 years) and in the whole population and we compared the results with our laboratory reference value. We also calculated the median time to reach several lymphocyte endpoints because of the clinical significance based on a previous report [26], as follows: time to reach CD3⁺ T cell ≥ 500 cells/μL, CD3⁺ T cell ≥ 1500 cell/μL, CD4⁺ T cells ≥ 50 cell/μL, CD4⁺ T cells ≥ 200. To evaluate the potential effect of ATG on T lymphocyte recovery in the post-transplantation period, we calculated the median and range of CD4⁺ and CD8⁺ T cell at 3 and 6 months after CBT in the patients who did not receive ATG in the conditioning regimen.

Pretransplantation variables studied for their potential impact on the lymphocyte endpoints were year of transplantation, recipient age, disease type, disease phase, autologous stem cell transplantation before UCBT, pretransplantation recipient cytomegalovirus (CMV) serology, HLA match at antigenic and allelic level, infused TNC dose, infused CD34⁺ cell dose, infused CD3⁺ cell dose, infused colony-forming unit, pretransplantation ATG dose, and GVHD prophylaxis.

Definition of infections

Severe infections starting from the day of progenitors infusion (day 0) to 24 months after transplantation were collected from all participating centers, according to predefined criteria [27].

Statistical analysis

Baseline characteristics were described as median, range, and interquartile range (IQR) for quantitative variables and frequency and percentages for categorical variables. Lymphocyte kinetics was described as median and range for each lymphocyte subset (CD4⁺ T cell, CD8⁺ T cell, B cell, and NK cell) at different time-points (3, 6, 12, 18, and 24 months) after transplantation by age (<20 and ≥20 years) and in the whole population. Additionally, we calculated the median and range of time to reach the different lymphocyte endpoints mentioned above in those patients at risk at the time of the analysis (those alive patients showing sustained engraftment).

We conducted a univariate analysis to assess the factors influencing lymphocyte recovery. Characteristics selected for inclusion in the multivariate model were those with *P* < .10 in univariate analysis. Cumulative incidence curves were used in a competing risk setting to calculate the cumulative incidence of neutrophil and platelet engraftment, aGVHD, cGVHD, relapse, and NRM for the entire population [28]. Death without engraftment was the competing event for neutrophil and platelet engraftment. Death without relapse was the competing event of relapse. Relapse or death without developing aGVHD or cGVHD were the competing events for aGVHD and cGVHD, respectively. Survival probability was calculated using Kaplan-Meier estimation in whole population [29]. A Cox proportional hazard model or the Fine and Gray method for competing events were used for multivariate analysis [30]. All statistical tests were conducted using SPSS statistical software (SPSS version 20.0, Chicago, IL). Cumulative incidence with competing risks was conducted in R software, version 3.1.1 (The CRAN project).

RESULTS

Patient and CBU Characteristics

A total of 225 patients were included in this study. Clinical characteristics are summarized in Table 1. During the study period, 225 consecutive patients underwent

Table 1
Patients, Cord Blood Grafts and Transplantation Characteristics (N = 225)

Variable	Value ^a
Age	
≤20 years	122
>20 years	103
Median age at transplantation, yr (range, IQR)	15 (0.3-60, 4-35)
Median weight at transplantation, kg (range, IQR)	48 (3-117, 16-70)
Gender, n (%)	
Male	126 (56)
Year of transplantation, n (%)	
2005-2009	104
2010-2015	121
Median time from initial diagnosis to transplant, months (range, IQR)	12 (0.3-181, 6-30)
Previous ASCT	29 (23)
Diagnosis, n (%)	
Acute lymphoblastic leukemia	87 (39)
Acute myeloid leukemia	70 (31)
Chronic myeloid leukemia	8 (4)
Myelodysplastic syndrome	7 (3)
Non-Hodgking lymphoma	6 (2)
Hodgking lymphoma	9 (4)
Myeloproliferative disease	3 (1)
Severe aplastic anemia	4 (2)
Metabolic disorder	8 (4)
Immunodeficiency	23 (10)
Disease phase ^b , n (%)	
Early	104 (55)
Intermediate	54 (28)
Advanced	34 (17)
Conditioning regimen, n (%)	
TT-FLU-BU-ATG	144 (64)
VP16-CY-TBI-ATG	36 (16)
CY-TBI-ATG	6 (3)
BU-CY-ATG	13 (6)
Other ^c	26 (11)
GVHD prophylaxis, n (%)	
CsA-PDN	138 (61)
CsA-MMF	87 (39)
Recipient CMV seropositive, n (%)	150 (67)
Recipient EBV seropositive, n (%)	166 (74)
Recipient ancestry, n (%)	
European	165 (73)
Non-european	60 (27)
ATG dose, n (%)	
Non-ATG	14 (6)
6 mg/kg	115 (51)
7.5 mg/kg	43 (19)
8 mg/kg	33 (15)
10 mg/kg	20 (9)
HLA-A, -B antigen, -DRB1 allele match to patient, n (%)	
4/6	86 (38)
5/6	98 (44)
6/6	41 (18)
Sex mismatch, n (%)	80 (35)
Post-thaw TNC dose, × 10 ⁷ /kg, median (range, IQR)	3.47 (0.5-26.3, 2.46-6.5)
Post-thaw CD34 ⁺ dose, × 10 ⁵ /kg, median (range, IQR)	1.35 (0.1-22.7, 0.9-2.26)
Post-thaw CD3 ⁺ dose, × 10 ⁴ /kg, median (range, IQR)	5.2 (0.5-89, 3.4-11)
Major ABO mismatch, n (%)	
Major	48 (21)
Minor	50 (22)
None	127 (57)

IQR indicates interquartile range; ASCT, autologous stem cell transplantation; TT, thiotepa; FLU, fludarabine; BU, busulfan; ATG, antithymocyte globulin; HLA, histocompatibility leukocyte antigen; TNC, total nucleated cell dose; VP16, etoposide; CY, cyclophosphamide; TBI, total body irradiation; MEL, melphalan; FLAG, fludarabine-AraC-G-CSF; IDA, idarubicine, GVHD, graft versus host disease; CsA, ciclosporine; PDN, prednisone; MMF, mycophenolate mophetil; CMV, citomegalivirus; EBV, Epstein-Barr virus.

^a Percentages may not sum to 100 because of rounding. ^b Only considered patients diagnosed with hematological malignancies. ^c Other conditioning include BU-CY-MEL-ATG (n = 7), FLAG-IDA-MEL-ATG (n = 7), FLU-BU-ATG (n = 8), Treosulfan-CY-ATG (n = 4). CBU were originally selected on basis of cell dose and HLA matching for HLA-A and -B antigens and for HLA-DRB1 alleles without consideration of HLA-C and -DQ in the matching algorithm

myeloablative sUCBT from an unrelated donor. Overall, the median age at transplantation was 15 years (range, .3 to 60; IQR, 4 to 35). Most patients had acute leukemia (n = 157, 70%). Among patients diagnosed with malignant diseases (n = 190, 84%), 104 (55%) of them were in early, 54 (28%) were in intermediate, and 32 (17%) were in advanced disease status before UCBT. Regarding HLA compatibility, the units were 4/6 (n = 86, 38%), 5/6 (n = 98, 44%), and 6/6 (n = 41, 18%) matched. Patients received different ATG doses: none (n = 14, 6%), 6 mg/kg (n = 115, 51%), 7.5 mg/kg (n = 43, 19%), 8 mg/kg (n = 33, 15%), and 10 mg/kg (n = 20, 9%) based on type of underlying disease (malignant or nonmalignant) and risk of relapse. Subsequently, this variable was dichotomized in ATG dose ≤ 6 mg/kg and > 6 mg/kg to conduct the analysis of predictive factors for lymphocyte reconstitution.

Median follow-up among survivors was 49.3 months (range, 12.1 to 67). The median of infused TNC, CD34+, and CD3+ cell counts were 3.47 × 10⁷/kg (range, .5 to 26.3; IQR, 2.46 to 6.5), 1.35 × 10⁶/kg (range, .1 to 22.7; IQR, .9 to 2.26), and 5.2 × 10⁶/kg (range, .5 to 89; IQR, 4 to 11), respectively. Forty-eight (21%) patients received UCB units with major ABO blood mismatch.

Transplantation Outcomes

The cumulative incidence of sustained donor engraftment by day 42 was 83% (95% confidence incidence [CI], 83% to 85%), and 20 (9%) patients experienced primary graft failure. The median times to neutrophil and platelet ≥ 20 × 10⁹/L engraftment were 22 days (range, 12 to 58 days) and 39 days (range, 15 to 182 days), respectively. The cumulative incidence of grades II to IV aGVHD at day 180 was 19.6% (95% CI, 14.2% to 22.4%). At day 180 after UCBT, 24 of 158 evaluable patients (15%) had active late or an overlap syndrome. The 5-year cumulative incidence of cGVHD was 8.1% (95% CI, 7.6% to 9.1%). The 5-year cumulative incidence of NRM was 32% (95% CI, 30.8% to 33.6%). The 5-year probabilities of overall survival and disease-free survival of the entire cohort were 49% (95% CI, 40% to 58%) and 53% (95% CI, 44% to 62%), respectively. The primary causes of death were infections (n = 60), relapse (n = 26), aGVHD (n = 6), primary graft failure (n = 3), and others (n = 8).

Lymphocyte Recovery Kinetics

The median times to reach the different lymphocyte endpoints are summarized in Table 2. Interestingly, the median absolute lymphocyte count of 674 cells/μL (range, 200 to 2300 cells/μL) was below the laboratory reference range value (1200 to 3400 cells/μL) by month 3 after transplantation.

Table 2
Median Times to Lymphocyte Subset Recoveries after UCBT

Lymphocyte Subset Endpoint	No. of Patients at Risk	Median Time, mo.	Range (IQR), mo.
ALC ≥ 300 cells/μL	188	6.7	1.9-19.6 (5.3-8.1)
CD3+ T cell ≥ 500 cells/μL	141	5.8	.5-23.5 (7.2-15.4)
CD3+ T cell ≥ 1500 cells/μL	106	13.3	3.3-53.2 (15.8-36.4)
CD4+ T cell ≥ 50 cells/μL	172	4.6	.9-6.1 (2.7-11.8)
CD4+ T cell ≥ 200 cells/μL	144	10.9	3.7-14.5 (4.9-13.3)
CD4+ T cell ≥ 500 cells/μL	146	14.3	4.6-35.6 (6.1-16.7)
CD8+ T cell ≥ 200 cells/μL	135	18.2	2.1-26 (3.8-22)
B cell ≥ 200 cells/μL	157	2.5	1.2-6.6 (1.4-5.9)
NK cell ≥ 100 cells/μL	179	.9	.8-6.1 (1.3-5.8)

ALC indicates absolute lymphocyte count.

Reconstitution of T cells

The median CD3+ T cell counts of 151 cells/μL (range, 0 to 621 cells/μL) at 6 months and 358 (range, 0 to 1781 cells/μL) at 12 months after transplantation were under the reference range value (900 to 4500 cells/μL). Of note, the median CD4+ T cell counts of 59 cells/μL (range, 0 to 399 cells/μL) and 115 cells/μL (range, 0 to 1266 cells/μL) were < 200 cells/μL by month 6 and 12 after transplantation. Additionally, median, range, and IQR of times to reach CD4+ T cell ≥ 200 cells/μL and ≥ 500 cells/μL were 10.9 months (range, 3.7 to 14.5; IQR, 4.9 to 13.3) and 14.3 months (range, 4.6 to 35.6; IQR, 6.1 to 16.7), respectively. Similarly, the median CD8+ T lymphocyte count of 74 cells/μL (range, 0 to 890 cells/μL) by month 12 was under the normal range value (.3 to 1.6 cells/μL). Median time, range, and IQR to reach CD8+ ≥ 200 cells/μL was 18.2 months (range, 2.1 to 26; IQR, 3.8 to 22). The CD4+ and CD8+ T lymphocyte kinetics in the first 24 months after UCBT by age and in whole population are shown in Figures 1 and 2, respectively. We observed better lymphocyte recovery for all cell populations in children than in adults. T lymphocyte immune recovery increased considerably in both adult and pediatric patients by 12 months, especially CD4+ T cells after transplantation remaining higher in pediatric population.

Interestingly, for the 14 patients who did not receive ATG in the conditioning regimen, the median CD4+ T cell counts were 83 cells/μL (range, 63 to 98 cells/μL) and 249 cells/μL (range, 168 to 398 cells/μL) by months 3 and 6 after UCBT, respectively. In those patients, the median CD8+ T cell counts were 79 cells/μL (range, 22 to 105 cells/μL) and 161 cells/μL (range, 101 to 189 cells/μL) at 3 and 6 months after UCBT, respectively.

Reconstitution of B and NK cells

In contrast to T lymphocyte recovery, B cell recovery was faster. The median count of 314 cells/μL (range, 0 to 1722; IQR, 0 to 754) was within the normal range value (200 to 2100 cells/μL) by 3 months and remained high and progressively increased by 24 months after transplantation. The median number of NK cell count of 288 cells/μL (range, 0 to 1552; IQR, 221 to 776) by 3 months, also was within the normal range value (100 to 1000 cells/μL), and remaining constantly high by 3 months and raising at 6 months. B and NK

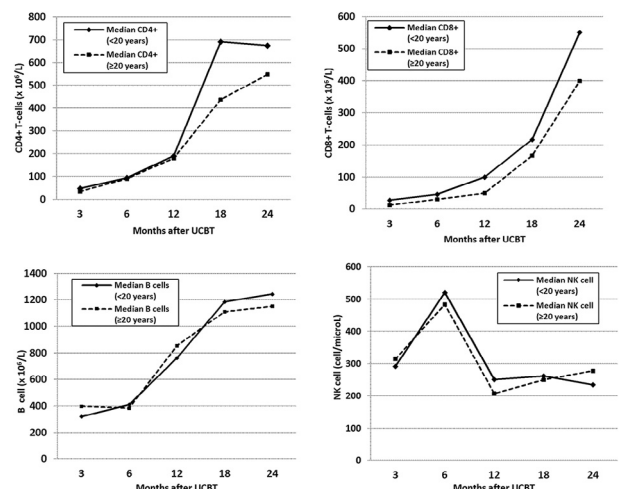


Figure 1. Median CD4+ T-cell recovery (A), CD8+ T-cell recovery (B), B cell recovery (C) and NK cell (D) after single-UCBT according to age.

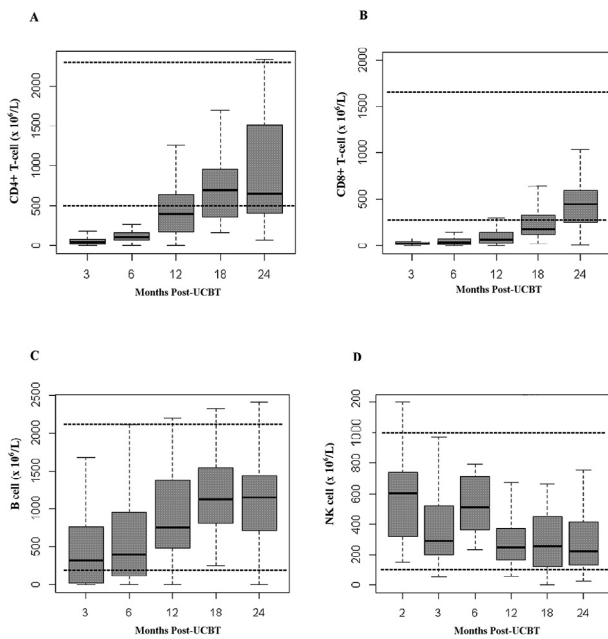


Figure 2. CD4⁺ T cell recovery (A), CD8⁺ T cell recovery (B), B cell recovery (C), and NK cell recovery (D) after single-unit UCBT using ATG in conditioning regimen in whole population. The boxes represent the interquartile range and the solid lines within the boxes represent the median value. The horizontal lines represent the normal ranges.

cell lymphocyte kinetics were similar in both pediatric and adult population. Recovery of B cell and NK cell by age and in whole population are shown in Figures 1 and 2.

Risk Factors for Immune Reconstitution

Regarding the whole cohort, factors associated with reaching the different lymphocyte endpoints in the univariate analysis are provided in Supplementary Data. In multivariate analysis (Table 3), the time to reach CD3⁺ T cell \geq 500 cells/ μ L was favorably affected by lower ATG dose (hazard ratio [HR], 2.8; 95% CI, 1.81 to 5.02; $P = .02$) and negative recipient CMV serostatus (HR, 2.1; 95% CI, 1.31 to 4.87; $P = .01$). The time needed to reach CD4⁺ T cell \geq 200 cells/ μ L was favorably affected by lower ATG dose (HR, 3.93; 95% CI, 2.3 to 5.83; $P = .001$), negative CMV recipient serostatus (HR, 3.76; 95% CI, 1.9 to 5.74; $P = .001$), and recipient's age (HR, 2.6; 95% CI, 1.01 to 3.47; $P = .03$). Lower ATG dose and negative CMV serostatus were in favor of CD8⁺ T cell \geq 200 cells/ μ L (HR, 3.03; 95% CI, 1.4 to 5.1; $P = .03$ and HR, 1.9; 95% CI, 1.63 to 2.15; $P = .01$, respectively). A favorable risk factor to reach B cell \geq 200 cells/ μ L was negative recipient NK serostatus (HR, 3.47; 95% CI, 1.3 to 4.25; $P = .03$). NK cell \geq 100 cells/ μ L was favorably affected by negative recipient CMV serostatus (HR, 2.3; 95% CI, 1.03 to 3.7; $P = .03$) and higher infused CD3⁺ dose (HR, 1.8; 95% CI, 1.1 to 2.8; $P = .04$).

Infectious Complications

The incidence of serious infections by type and time period is summarized in Figure 3. One hundred eighty-six patients (83%) had 1 or more infections in the first 30 days after UCBT, 67% of patients had 1 or more infections between days 31 and 100, 54% had 1 or more infections between days 101 and 180, 38% had 1 more infections between days 181 and 365, 33% had 1 or more infections between days 366 and 540, and 15% had 1 or more infections between days 541 and 730.

Table 3

Fine and gray multivariate analysis for lymphocyte recoveries

Outcome	HR	95% CI	P-value
CD3⁺ T cell \geq 500 cells/μL			
ATG dose			
\leq 6 mg/kg	2.8	1.81-5.02	
$>$ 6 mg/kg	1		.02
CMV recipient serostatus			
Positive	1		
Negative	2.1	1.31-4.87	.01
CD3⁺ T cell \geq 1500 cells/μL			
CMV recipient serostatus			
Positive	1		.01
Negative	2.3	1.81-3.01	
Recipient age			
\leq 20 years	2.02	1.01-3.41	.03
$>$ 20 years	1		
CD4⁺ T cell \geq 200 cells/μL			
CMV recipient serostatus			
Positive	1		.001
Negative	3.76	1.9-5.74	
Recipient age			
\leq 20 years	2.61	1.01-3.47	.03
$>$ 20 years	1		
ATG dose			
\leq 6 mg/kg	3.93	2.3-5.83	.001
$>$ 6 mg/kg	1		
CD4⁺ T cell \geq 500 cells/μL			
CMV recipient serostatus			
Positive	1		.04
Negative	1.87	1.1-2.8	
CD8⁺ T-cell \geq 200 cells/μL			
ATG dose			
\leq 6 mg/kg	3.03	1.4-5.1	.03
$>$ 6 mg/kg	1		
CMV negative			
Positive	1		
Negative	1.9	1.63-2.15	.01
B cell \geq 200 cells/μL			
CMV recipient serostatus			
Positive	1		.03
Negative	3.47	1.3-4.25	
NK cell \geq 100 cells/μL			
CMV recipient serostatus			
Positive	1		.03
Negative	2.3	1.03-3.7	
Total CD3 dose			
$<4 \times 10^6$ /kg	1		.04
$\geq 4 \times 10^6$ /kg	1.8	1.1-2.8	

HR indicates hazard ratio; CI, confidence interval; CMV, cytomegalovirus; ATG, antithymocyte globulin.

Sixty infections caused death and 6 infections contributed to death, with the primary causes of death in addition to graft failure ($n = 2$) and GVHD ($n = 4$). Lethal infections happened during a wide range period from day 13 to 872 after UCBT, 6 of them occurred by the first year after transplantation. Indeed, after day 180, serious infections remained common, mainly caused by viral infections (73%).

DISCUSSION

Our study shows the main factors associated to better immune reconstitution after UCBT, such as lower ATG dose in conditioning regimen, negative recipient CMV serostatus, and a younger recipient age, demonstrating their influence to reach higher T lymphocyte subset recovery counts.

Despite a number of groups have compared the immune recovery by sources [5,10,31-33], there are limited data assessing the predictive factor for lymphocyte subset recovery after transplantation [3]. Commonly, a transient delay in the first few months after UCBT is observed but patients achieve normal levels of CD4⁺ T cell counts and TCR repertoire

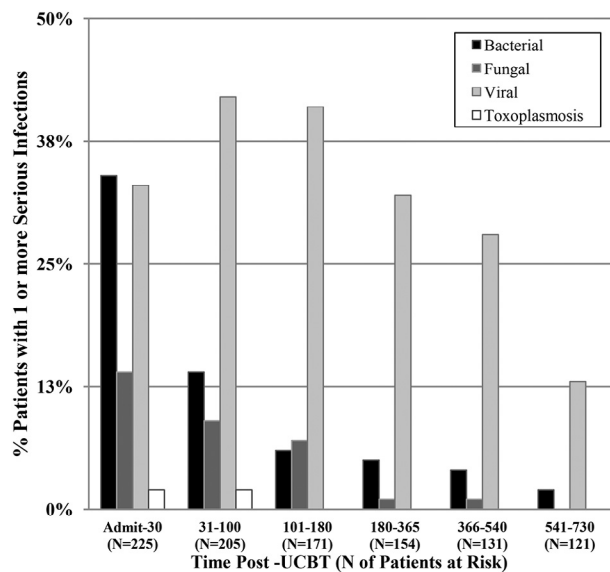


Figure 3. Incidence of serious infections by type and time period in the first 2 years post-CBT.

diversity after 1 year. In concordance, other studies observed a marked delay of immune recovery after sUCBT incorporating ATG in conditioning regimen, where immune reconstitution was reported to occur at a median time of CD4⁺ T lymphocyte recovery ≥ 200 cells/ μ L of 9 and 12 months [3,34-37]. These results are in line with ours because we observed a median time of CD4⁺ T cell counts recovery ≥ 200 cells/ μ L of 12.9 months after UCBT.

With the aim of improving cellular immune recovery after UCBT, different groups [37,38] adopted alternative strategies, such as the omission of ATG in the conditioning regimen in pediatric and adult patients. For instance, Sauter et al. observed a median time to reach CD4⁺ T lymphocyte count ≥ 200 cells/ μ L of 4 months and, consequently, opportunistic infections, especially viral infections, dramatically decreased after double UCBT with the omission of ATG in the conditioning regimen in a cohort of older patients (median age, 36 years). These results are in contrast to ours because incidence of opportunistic infections remained common in the late period after UCBT due to persistent T lymphocyte recovery. Chiesa et al. also omitted ATG in the conditioning regimen in a pediatric cohort and consequently described a pattern of early immune reconstitution after UCBT and observed a rapid increase of T cell counts over the first 2 months after transplantation, especially of the CD4⁺ compartment, with median CD4⁺ T cell counts at 30 and 60 days after UCBT of 310 cells/ μ L and 560 cells/ μ L, respectively, differing significantly from our results, where we found a median CD4⁺ T cell count of 41 cells/ μ L at 3 months after transplantation.

Komaduri et al. [6] observed that absolute CD8⁺ T lymphocytes counts approached normal values by 1 year after UCBT using ATG in conditioning regimen [6]. However, we found a CD8⁺ T lymphocyte recovery more delayed: we observed a median CD8⁺ T lymphocyte counts nearly 200 cells/ μ L (185 cells/ μ L) at 18 months after transplantation. Nevertheless, in UCBT with the omission of ATG, CD8⁺ T lymphocytes show faster recovery compared with other studies [36]. Indeed, studies omitting pretransplantation ATG infusion observed a median time to reach a CD8⁺ T cell count ≥ 200 cells/ μ L of 2 months [38].

Admiraal R et al. [39] studied the relationship between an active dose of ATG and immune reconstitution in children after HSCT by measuring ATG exposure and maintaining the ATG dose below the lympholytic concentration using a pharmacokinetic model. Within the cord blood group, they noted decreased immune reconstitution at lowest area under the curve compared with those after grafts of bone marrow or peripheral blood; therefore, immune recovery could be more susceptible to ATG.

Previous studies reveal the impact of CMV serostatus on the immune recovery pattern after transplantation [33,40]. The risk of CMV infection in UCBT recipients is not associated with donor serology, which reflects the maternal exposure history rather than active or latent infection. However, CBU lack CMV-specific memory cells that would confer adoptive immune protection against CMV, and this might have significant implications on the occurrence of CMV infections, especially in CMV-seropositive recipients, who reactivate CMV in nearly 50% of the cases; on the contrary, the incidence of CMV reactivation in CMV-seronegative patients is about 1.3% [41].

We found that age is a significant factor influencing post-transplantation immune recovery in our population, probably because of thymic involution. Klein et al. and other groups [9,42] conducted different studies in pediatric and adult cohorts demonstrating a marked difference in the kinetics of thymic recovery between the 2 groups but did not clarify if the actual cause was related to age or infused TNC dose.

Although our study includes a relatively high number of patients using common clinical practice and biological assessment, it has limitations inherent to retrospective analyses and the wide diversity of underlying diseases and ages of patients. However, the results are conclusive in demonstrating the leading factors affecting the lymphocyte subset recovery after UCBT. Of note, an additional limitation of our study is the unavailability of immunoglobulin value or T-cell excision circles value after transplantation and the inability to study qualitative immune recovery.

In conclusion, the dose of ATG administered in conditioning regimens is the main factor in our population that promotes a serious impact on both early and delayed immune recovery in UCBT recipients. These results highlight the importance of optimizing use of ATG, including new strategies such as change of dosage and timing or omitting its use, with the aim of improving immune reconstitution after UCBT. Other factors, such as age and CMV serostatus, also play a role that may be considered when designing new UCBT protocols to avoid infectious-related mortality.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial disclosure: N.C is supported by a fellowship of Banc de Sang i Teixits and Fundació La Marató de TV3 (File number 20133230). This work has been conducted within the framework of the Doctorate in Medicine of the Universitat Autònoma de Barcelona. D.V and S.Q. contributed equally to this work.

Conflict of interest statement: There are no conflicts of interest to report.

Authorship statement: D.V and S.Q. contributed equally to this work.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data related to this article can be found online at [doi:10.1016/j.bbmt.2016.11.014](https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2016.11.014).

REFERENCES

- Barker JN, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003;48:35-43.
- Rocha V, Wagner JE Jr, Sobocinski KA, et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med*. 2000;342:1846-1854.
- Niehues T, Rocha V, Filipovich AH, et al. Factors affecting lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children—a Eurocord analysis. *Br J Haematol*. 2001;114:42-48.
- Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood*. 2010;115:3861-3868.
- Kanda J, Chiou LW, Szabolcs P, et al. Immune recovery in adult patients after myeloablative dual umbilical cord blood, matched sibling, and matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18:1664-1676.
- Komanduri KV, St. John LS, de Lima M, et al. Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T cell skewing. *Blood*. 2007;110:4543-4551.
- Brown JA, Stevenson K, Kim HT, et al. Clearance of CMV viremia and survival after double umbilical cord blood transplantation in adults depends on reconstitution of thymopoiesis. *Blood*. 2010;115:4111-4119.
- Thomson BG, Robertson KA, Gowan D, et al. Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood*. 2000;96:2703-2711.
- Klein AK, Patel DD, Gooding ME, et al. T-cell recovery in adults and children following umbilical cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001;7:454-466.
- Jacobson CA, Turki AT, McDonough SM, et al. Immune reconstitution after double umbilical cord blood stem cell transplantation: comparison with unrelated peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18:565-574.
- Chung B, Barbara-Burnham L, Barsky L, et al. Radiosensitivity of thymic interleukin-7 production and thymopoiesis after bone marrow transplantation. *Blood*. 2001;98:1601-1606.
- Kottaridis PD, Milligan DW, Chopra R, et al. In vivo CAMPATH-1H prevents graft-versus-host disease following nonmyeloablative stem cell transplantation. *Blood*. 2000;96:2419-2425.
- Peggs KS. Role of MabCampath in allogeneic transplantation. *Ann Hematol*. 2004;83(suppl 1):S66-S68.
- Chakraverty R, Orti G, Roughton M, et al. Impact of in vivo alemtuzumab dose before reduced-intensity conditioning and HLA-identical sibling stem cell transplantation: pharmacokinetics, GVHD, and immune reconstitution. *Blood*. 2010;116:3080-3088.
- Juliussen G, Theorin N, Karlsson K, et al. Subcutaneous alemtuzumab vs ATG in adjusted conditioning for allogeneic transplantation: influence of Campath dose on lymphoid recovery, mixed chimerism and survival. *Bone Marrow Transplant*. 2006;37:503-510.
- Fehse N, Fehse B, Kroger N, et al. Influence of anti-thymocyte globulin as part of the conditioning regimen on immune reconstitution following matched related bone marrow transplantation. *J Hematother Stem Cell Res*. 2003;12:237-242.
- Meijer E, Bloem AC, Dekker AW, et al. Effect of antithymocyte globulin on quantitative immune recovery and graft-versus-host disease after partially T-cell-depleted bone marrow transplantation: a comparison between recipients of matched related and matched unrelated donor grafts. *Transplantation*. 2003;75:1910-1913.
- Terasako K, Sato K, Sato M, et al. The effect of different ATG preparations on immune recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for severe aplastic anemia. *Hematology*. 2010;15:165-169.
- Savani BN, Mielke S, Rezvani K, et al. Absolute lymphocyte count on day 30 is a surrogate for robust hematopoietic recovery and strongly predicts outcome after T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13:1216-1223.
- Small TN, Avigan D, Dupont B, et al. Immune reconstitution following T cell-depleted bone marrow transplantation: effect of age and posttransplant graft rejection prophylaxis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1997;3:65-75.
- Lewin SR, Heller G, Zhang L, et al. Direct evidence for new T-cell generation by patients after either T-cell-depleted or unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Blood*. 2002;100:2235-2242.
- Sanz J, Boluda JC, Martín C, et al. Single-unit umbilical cord blood transplantation from unrelated donors in patients with hematological malignancy using busulfan, thiopeta, fludarabine and ATG as myeloablative conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47:1287-1293.
- Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of HLA-matched sibling donors. *Transplantation*. 1974;18:295-304.
- Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, et al. 1994 consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant*. 1995;15:825-828.
- Gratwohl A. The EBMT risk score. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47:749-756.
- Rénard C, Barlogis V, Mialou V, et al. Lymphocyte subset reconstitution after unrelated cord blood or bone marrow transplantation in children. *Br J Haematol*. 2011;152:322-330.
- van Burik JA, Carter SL, Freifeld AG, et al. Higher risk of cytomegalovirus and aspergillus infections in recipients of T cell depleted unrelated bone marrow: analysis of infectious complications in patients treated with T cell depletion versus immunosuppressive therapy to prevent graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13:1487-1498.
- Gray RJ. A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *Ann Stat*. 1988;16:1141-1154.
- Kaplan EL, Meier P. Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958;53:457-481.
- Fine J. A proportional hazards model for subdistribution of a competing risk. *J Am Stat Assoc*. 1999;94:496-509.
- Servais S, Lengline E, Porcher R, et al. Long-term immune reconstitution and infection burden after mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20:507-517.
- Oshrine BR, Li Y, Teachey DT, Heimall J, Barrett DM, Bunin N. Immunologic recovery in children after alternative donor allogeneic transplantation for hematologic malignancies: comparison of recipients of partially T cell-depleted peripheral blood stem cells and umbilical cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19:1581-1589.
- Bartelink IH, Belitser SV, Knibbe CA, et al. Immune reconstitution kinetics as an early predictor for mortality using various hematopoietic stem cell sources in children. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19:305-313.
- Brown JA, Boussiotis VA. Umbilical cord blood transplantation: basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. *Clin Immunol*. 2008;127:286-297.
- Burke MJ, Vogel RI, Janardan SK, et al. Early lymphocyte recovery and outcomes after umbilical cord blood transplantation (UCBT) for hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17:831-840.
- Moretta A, Maccario R, Fagioli F, et al. Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. *Exp Hematol*. 2001;29:371-379.
- Chiesa R, Gilmour K, Qasim W, et al. Omission of in vivo T-cell depletion promotes rapid expansion of naïve CD4+ cord blood lymphocytes and restores adaptive immunity within 2 months after unrelated cord blood transplant. *Br J Haematol*. 2012;156:656-666.
- Sauter C, Abboud M, Jia X, et al. Serious infection risk and immune recovery after double-unit cord blood transplantation without antithymocyte globulin. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17:1460-1471.
- Admiraal R, van Kesteren C, Jol-van der Zijde CM, et al. Association between anti-thymocyte globulin exposure and CD4+ immune reconstitution in paediatric haemopoietic cell transplantation: a multicentre, retrospective pharmacodynamic cohort analysis. *Lancet Haematol*. 2015;2:e194-e203.
- Schmidt-Hieber M, Schwarck S, Stroux A, et al. Immune reconstitution and cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation: the important impact of in vivo T cell depletion. *Int J Hematol*. 2010;91:877-885.
- Beck JC, Wagner JE, DeFor TE, et al. Impact of cytomegalovirus (CMV) reactivation after umbilical cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16:215-222.
- Lindemans CA, Chiesa R, Amrolia PJ, et al. Impact of thymoglobulin prior to pediatric unrelated umbilical cord blood transplantation on immune reconstitution and clinical outcome. *Blood*. 2014;123:126-132.

Discusión

Sobre el primer trabajo de la Tesis

El primero de los trabajos que conforman esta Tesis Doctoral fue publicado en 2015, siendo el objetivo de éste analizar los factores predictivos de la recuperación linfocitaria post-TSCU y consecuentemente, conocer el impacto de dicha reconstitución linfocitaria sobre los resultados globales del TSCU.

Este estudio identificó los principales factores predictivos de alcanzar un CAL determinado en el día +42 (CAL42) post-TSCU, como son la dosis infundida de linfocitos T CD3+ contenidos en la unidad de SCU, la dosis de GAT administrada como parte del acondicionamiento y el grado de compatibilidad del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) entre donante y receptor. A su vez, el hecho de alcanzar dicho CAL post-TSCU demostró tener impacto sobre la mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) y la supervivencia. En nuestro estudio elegimos un tiempo post-TSCU de 42 días basado en un estudio previo (*Ruggeri A, 2011*). Aunque hay varios trabajos publicados que han confirmado la influencia del CAL en los resultados globales del TSCU (*Komanduri KV, 2007; Burke MJ, 2011; Tedesch SK, 2011, Jacobson CA, 2012; Somers JA, 2013*), hay poca información sobre los factores predictivos de la recuperación linfocitaria tras el TSCU.

La relevancia de la dosis infundida de linfocitos T CD3+ para la reconstitución linfocitaria del receptor confirma la importancia de los linfocitos T pasajeros post-tímicos infundidos. Esto puede deberse al hecho que la administración de un exceso de linfocitos, especialmente cuando se usan fármacos que producen depleción linfocitaria T *in vivo*, facilitaría la persistencia de algunas subpoblaciones de linfocitos que acelerarían la recuperación linfocitaria.

Aunque en este trabajo no estudiamos el efecto de las diferentes subpoblaciones linfocitarias infundidas, nuestros datos estarían de acuerdo con otros trabajos que han demostrado una asociación entre los recuentos de linfocitos T CD8+ infundidos y los resultados a largo plazo tras el TSCU. El

análisis comparativo de las subpoblaciones linfocitarias en TSCU y Alo-TPH de SP reveló peculiaridades fenotípicas y funcionales de los PH de la SCU (Terakura S, 2007; Moscardó F, 2014). Estos hallazgos se centran concretamente en las especificidades de los linfocitos T como célula clave tras el TSCU. En este sentido hay autores (Mold JE, 2010) que sugirieron que los linfocitos T fetales y del adulto surgen de diferentes poblaciones de PH que están presentes en diversas etapas del desarrollo. Por lo tanto, los linfocitos de la SCU parecen derivar en gran parte de la ontogenia, lo que podría conferir diferentes propiedades a la biología del TSCU. Asimismo, pueden ser responsables de algunas de las diferencias en los hallazgos clínicos tras el TSCU (Danby R, 2014). En un estudio previo nuestro grupo evaluó el impacto del recuento de las células CD45+ viables infundidas en los resultados del TSCU y los efectos potenciales de estos leucocitos, atribuyendo los resultados post-TSCU al efecto potencial a éstos (Castillo N, 2015). Los datos del estudio actual, identifican la fracción de linfocitos T como la principal mediadora de tales efectos. Por lo tanto, las estrategias capaces de preservar los linfocitos T viables junto con la aplicación de un mayor grado de compatibilidad del CMH podrían constituir un buen sistema para acelerar la reconstitución inmune (RI) sin aumentar el riesgo de enfermedad injerto contra receptor (EICR).

En un esfuerzo por favorecer el injerto y limitar la EICR, algunos grupos han utilizado la DCT *in vivo* en el régimen de acondicionamiento, aunque probablemente se asocie a un retraso de reconstitución linfocitaria T (Saliba RM, 2015; Pascal L, 2015) y podría contribuir a un aumento en la incidencia de infecciones oportunistas (IO) debido a la limitación del repertorio del RCT y a una inversión de la relación normal CD4+:CD8+. Como consecuencia directa de la recuperación retrasada de los linfocitos, los pacientes se encuentran en un elevado riesgo de MRT, debido principalmente a infecciones, que fue la causa de muerte principal en el presente estudio. Esto podría explicar nuestros resultados identificando al CAL42 como un factor de riesgo de mortalidad asociada a IO. Con el propósito de mejorar la RI post-TSCU, otros grupos han propuesto la omisión de GAT del régimen de acondicionamiento (Sauter C, 2011; Chiesa R, 2012). En este contexto, se observó una recuperación más

rápida de linfocitos con una expansión temprana de los linfocitos T en SP, hecho que resultó en una menor mortalidad por infección con sólo un aumento moderado de la incidencia de EICR. Esta combinación promovió una supervivencia notablemente elevada. A diferencia de otros estudios, en nuestra cohorte la incidencia de EICRa fue inferior a la observada en los receptores de un dTSCU (*Ponce DM, 2013*), un hecho que podría explicarse debido a una menor dosis de celularidad infundida y por el efecto de la GAT. Además, este último factor podría explicar que no se observara asociación entre el CAL y EICRa, dato contrario a otros estudios previos (*Gul Z, 2015*). En anteriores estudios realizados en receptores de Alo-TPH con AMA de DNE en adultos con neoplasias hematológicas, la GAT se asoció a una menor incidencia y gravedad de MRT. Otros autores han reportado los resultados de la inclusión de GAT en el acondicionamiento en receptores de un Alo-TPH con AMA o AIR ya fuera para tratar enfermedades malignas o no malignas (*Lindemans CA, 2014*) y se objetivó que aunque la probabilidad de EICRa severa fue menor en el grupo que recibió GAT, la recuperación linfocitaria fue más retrasada y las infecciones por reactivaciones virales fueron mayores en dicho grupo. A pesar de los resultados expuestos en el anterior estudio (*Ponce DM, 2013*) se objetivó una supervivencia similar en los receptores que recibieron y en los que no recibieron GAT.

Otro hallazgo de nuestro estudio fue la asociación entre el grado de compatibilidad del CMH entre donante y receptor y la recuperación de linfocitos post-TSCU, dato similar al previamente reportado en otro estudio (*Komandura KV, 2007*) donde se observó una reconstitución linfocitaria retrasada asociada a la incompatibilidad del CMH, hecho que es altamente frecuente en el TSCU. Otros grupos han demostrado el efecto independiente de la compatibilidad del CMH estudiado por alta resolución (*Terakura S, 2016*) demostrando mejores resultados en el caso de una mayor compatibilidad si se tienen en cuenta los alelos del CMH por alta resolución (A-, B-, C- y -DRB1). Estos resultados sugieren la precaución de no seleccionar unidades de SCU con 3 ó más incompatibilidades en el CMH tendiendo en cuenta los 8 alelos. Por lo tanto, nuestros datos son similares a los de otros grupos y enfatizan la necesidad de

buscar un mayor grado de compatibilidad del CMH (*Eapen M, 2014; Oran B, 2015*) con el fin de obtener mejores resultados.

A pesar de la gran diversidad de enfermedades y amplio rango de edad de los pacientes, nuestros resultados identifican los factores principales con impacto sobre la recuperación de linfocitos post-TSCU. Una de las limitaciones de este estudio es el uso del valor del CAL como indicador de la RI y aunque es fácil de obtener, determina de una manera muy general la medición de ésta. Nuestros datos confirman el impacto de un valor más bajo del CAL42 sobre los principales resultados post-TSCU. Este hallazgo podría ser de gran utilidad para terapias con transferencia adoptiva usando linfocitos de SCU expandidos *ex vivo*.

Como conclusión a este primer trabajo, encontramos que la infusión de un elevado número de linfocitos CD3+ contenidos en la unidad de SCU, la administración de una dosis menor de GAT en el régimen de acondicionamiento y una selección de unidades de SCU con mayor grado de compatibilidad del CMH, fueron los principales factores que contribuyeron a alcanzar valores más elevados del CAL42 y consecuentemente demostró una menor MRT y mayor supervivencia. Por lo tanto, estos hallazgos son de interés y a tener en cuenta para la selección de unidades de SCU, haciendo hincapié en la interacción positiva entre el conteo de células, especialmente linfocitos y el grado de compatibilidad del CMH entre la unidad de SCU y el receptor. El hecho de mejorar la selección de la unidad de SCU y el uso de nuevas estrategias de profilaxis de EICR que consigan reducir o evitar el uso de GAT en el régimen de acondicionamiento, sería fundamental para mejorar la RI precoz y por tanto los resultados post-TSCU.

Sobre el segundo trabajo de la Tesis

Este estudio identificó los principales factores asociados a una mejor RI de las diferentes subpoblaciones linfocitarias tras el TSCU, tales como una menor dosis de GAT administrada en el régimen de acondicionamiento, el estado serológico negativo de CMV del receptor y una edad menor del receptor, demostrando su influencia para alcanzar mayores recuentos en la recuperación de las subpoblaciones de linfocitos T post-TSCU.

A pesar que estudios previos han comparado la RI tras el Alo-TPH a partir de las diferentes fuentes de PH (*Servais S, 2004; Kanda J, 2012; Jacobson CA, 2012; Oshrine BR, 2013; Bartelink IH, 2013*), hay datos limitados en cuanto a la evaluación de los factores predictivos de la reconstitución de las diferentes subpoblaciones de linfocitos después del trasplante (*Niehues T, 2001*). Normalmente, se observa un retraso transitorio en los primeros meses post-TSCU, pero los pacientes alcanzan niveles normales en el recuento de linfocitos T CD4+ y en la diversidad del repertorio del RCT a partir del primer año post-TSCU. De acuerdo con esto, otros estudios observaron un retraso marcado de la RI después de la incorporación de GAT en el régimen de acondicionamiento, con una mediana de tiempo en la recuperación de linfocitos T CD4+ ≥ 200 células/ μ L a los +9 y +12 meses respectivamente (*Niehues T, 2001; Moretta A, 2001; Brown JA, 2011; Burke MJ, 2011; Chiesa R, 2012*). Estos resultados están de acuerdo con los nuestros, ya que observamos una mediana de tiempo de recuperación de linfocitos T CD4+ ≥ 200 células/ μ L de 12.9 meses tras el TSCU.

Con el objetivo de mejorar la RI tras el TSCU, diferentes grupos (*Sauter C, 2011; Chiesa R, 2012*) adoptaron estrategias alternativas como la omisión de la GAT en el régimen de acondicionamiento tanto en pacientes pediátricos como adultos. Por ejemplo, Sauter et al. (*Sauter C, 2011*) observaron una mediana de tiempo de 4 meses para alcanzar un recuento de linfocitos T CD4+ ≥ 200 células/ μ L y en consecuencia las infecciones oportunistas (IO), especialmente infecciones virales, disminuyeron drásticamente después de un doble TSCU (dTSCU) tras la omisión de GAT en una cohorte de pacientes adultos (edad

mediana: 36 años). Estos resultados son contrarios a los nuestros ya que la incidencia de las IO continuó siendo elevada en el período tardío después del TSCU debido a una falta persistente de reconstitución de linfocitos T. Chiesa et al. (Chiesa R, 2012) también omitieron la GAT del régimen de acondicionamiento y en consecuencia describieron un patrón de RI precoz post-TSCU en una cohorte pediátrica observando un rápido aumento del recuento de linfocitos T durante los 2 primeros meses post-trasplante, especialmente del compartimento T CD4+, con una mediana del recuento de éstos en el día +30 y +60 de 310 células/ μ L y 560 células/ μ L, respectivamente, lo que difiere significativamente con nuestros resultados, en los que se observó una mediana del recuento de linfocitos T CD4+ de 41 células/ μ L a los 3 meses después del trasplante.

Komaduri et al. (Komanduri KV, 2007) observaron que el valor absoluto de linfocitos T CD8+ se aproximaba a los valores normales a +1 año post-TSCU incluyendo GAT en el régimen de acondicionamiento. Sin embargo, nuestro estudio objetivó una recuperación de linfocitos T CD8+ más retrasada ya que observamos una mediana del recuento de éstos cerca de 200 células/ μ L (185 células/ μ L) a los 18 meses post-trasplante. Sin embargo, tras el TSCU con omisión de la GAT, los linfocitos T CD8+ muestran una recuperación más rápida en comparación con otros estudios que utilizan GAT (Moretta A, 2001). De hecho, los estudios que omitieron la administración de GAT pre-trasplante observaron una mediana de tiempo de 2 meses para alcanzar un recuento de linfocitos T CD8 + \geq 200 células/ μ L.

Admiraal et al. (Admiraal R, 2015) estudiaron la relación entre una dosis activa de GAT y la RI tras diferentes modalidades de Alo-TPH en niños, midiendo la exposición a GAT y manteniendo la dosis de ésta por debajo de la concentración linfólítica usando un modelo farmacocinético. Entre los diferentes tipos Alo-TPH, observaron una disminución de la RI en el área inferior bajo la curva en el TSCU comparada con el Alo-TPH de MO o de SP. Por lo tanto, la RI post-TSCU podría ser más susceptible al efecto de la GAT.

Estudios anteriores revelan el impacto del estado serológico del CMV en el patrón de RI tras del trasplante (*Bartelink IH, 2013; Smidt-Heiber M, 2011*). El riesgo de infección por CMV en los receptores de TSCU no está asociado a la serología del donante, la cual refleja la historia de exposición materna en lugar de la infección activa o latente. Sin embargo, la SCU carece de linfocitos de memoria específicos contra CMV que confieran protección inmunológica adoptiva frente a CMV, lo que podría tener implicaciones significativas en la ocurrencia de infecciones por CMV, especialmente en receptores seropositivos para éste y que reactivan CMV en casi el 50% de los casos, mientras que la incidencia de reactivación de CMV en pacientes seronegativos es de aproximadamente el 1.3% (*Beck JC, 2010*).

La edad fue uno de los factores que influyó en la RI post-trasplante en nuestro estudio, probablemente debido a la involución tímica. Klein et al. y otros grupos (*Klein AK, 2001; Lindemans CA, 2014*) llevaron a cabo diferentes estudios comparando la RI en pacientes en cohortes pediátricos y adultos demostrando una marcada diferencia en la cinética de reconstitución tímica entre los 2 grupos de edad, pero no quedó claro si la causa real se debió a la edad o a la dosis de CNT infundidas.

Aunque nuestro estudio incluyó un número relativamente alto de pacientes donde se emplea una práctica clínica y una evaluación biológica común, continúa teniendo limitaciones inherentes al análisis retrospectivo, a la gran diversidad de enfermedades subyacentes y a la edad de los pacientes. Sin embargo, los resultados demuestran los principales factores que afectan a la recuperación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos después del TSCU. Una limitación adicional de nuestro estudio es la falta de disponibilidad del valor de inmunoglobulinas o de TREC tras el trasplante y la incapacidad para estudiar la RI cualitativa.

En conclusión, en nuestra población de estudio, la dosis de GAT administrada en los regímenes de acondicionamiento es el factor principal con impacto desfavorable tanto para la RI temprana como tardía de las diferentes subpoblaciones de linfocitos en los receptores de un TSCU. Estos resultados

ponen de manifiesto la importancia de optimizar el uso de GAT en el acondicionamiento, incluyendo nuevas estrategias como el cambio de dosis y tiempo de administración o la omisión de su uso con el objetivo de mejorar la RI tras el TSCU. Otros factores como la edad y el estado serológico del CMV también desempeñan un papel que debería ser considerado al diseñar nuevos protocolos de TSCU por tal de disminuir y/o evitar la mortalidad relacionada con infecciones.

Próximos pasos

Los trabajos que conforman la presente Tesis Doctoral han estudiado varios factores relevantes en el contexto del TSCU, con especial atención a la RI que ocurre durante el periodo post-trasplante. En el primer trabajo, se demuestran los factores pre-trasplante que favorecen el proceso de recuperación linfocitaria. En esta misma fase, se demostró que el hecho de alcanzar un determinado CAL en el periodo precoz post-trasplante se asocia a una reducción de la MRT y a un aumento de la supervivencia. En el segundo trabajo mostramos el patrón de recuperación linfocitaria post-TSCU de cada una de las subpoblaciones evidenciando un importante retraso de reconstitución de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ respectivamente y hallamos los factores pre-trasplante con influencia sobre este evento.

Como ya hemos observado, los resultados globales tras el TSCU en nuestro estudio no son óptimos, ya que la supervivencia global a largo plazo es de alrededor del 50%.

Los principales problemas que se asocian al TSCU son los siguientes:

- El excesivo retraso de la cinética de la RI linfocitaria T post-TSCU.
- Dicho retraso en la RI linfocitaria T conlleva a una elevada frecuencia de IO constituyendo la primera causa de muerte en los receptores.

La línea de investigación a desarrollar en los siguientes años debe solucionar estos problemas basándose en la mejora de la RI. Para ello se plantean las siguientes estrategias:

- 1- Modificar el régimen de acondicionamiento por tal de optimizar la exposición a GAT. En este sentido, se puede plantear individualizar la dosis de GAT o incluso eliminarla en algunos casos por tal de obtener una exposición óptima para mejorar la reconstitución linfocitaria T y en consecuencia disminuir la MRT por IO y de esta manera mejorar la supervivencia.

- 2- Utilizar criterios de selección de las unidades de SCU que aumenten la probabilidad del EICT y minimicen el riesgo de EICR.

- 3- Desarrollar estrategias asociadas de inmunoterapia adoptiva para tratar las IO y las recaídas en el contexto de este tipo de Alo-TPH donde no existe la posibilidad de recurrir al donante para dichos propósitos.

Conclusiones

Las conclusiones de los estudios que conforman esta Tesis Doctoral son:

1-La cinética de la RI linfocitaria se encuentra retrasada en el periodo y tardío post-TSCU.

2-Los factores pre-TSCU con influencia sobre la RI del contaje CAL son: una dosis más elevada de linfocitos T CD3+ infundida, un mayor grado de compatibilidad del CMH y una menor dosis de GAT administrada en el régimen de acondicionamiento.

3-El hecho de mostrar una RI linfocitaria adecuada y precoz post-TSCU ofrece mejores resultados proporcionando una menor MRT y una mejor supervivencia.

4-La RI de cada una de las subpoblaciones linfocitarias también se encuentra retrasada, especialmente la subpoblación de linfocitos T tanto en el momento precoz como tardío post-TSCU. El estudio ha determinado que existen factores favorecedores de la RI como la administración de una dosis menor de GAT, el serostatus negativo de CMV del receptor previo al TSCU y una menor edad del receptor.

5-La principal causa de MRT tras el TSCU son las IO, con una frecuencia considerablemente elevada tanto en el periodo precoz como en el periodo tardío post-TSCU.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- 1- Armstrong AE, Smyth E, Helenowski IB et al. The Impact of High-resolution HLA-A, HLA-B, HLA-C, and HLA-DRB1 on Transplant-related Outcomes in Single-unit Umbilical Cord Blood Transplantation in Pediatric Patients. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2017 Jan;39(1):26-32.
- 2- Astori G, Adami V, Mambrini G ,et al. Evaluation of exvivo expansion and engraftment in NOD-SCID mice of umbilical cord blood CD34+ cells using the DIDECO “PluricellSystem”. *Bone Marrow Transplant* (2005) 35(11):1101–6.
- 3- Atsuta Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T et al. Disease-specific analyses of unrelated cord blood transplantation compared with unrelated bone marrow transplantation in adult patients with acute leukemia. *Blood*. 2009 Feb 19;113(8):1631-8.
- 4- Avery S, Shi W, Lubin M ,et al. Influence of infused cell dose and HLA match on engraftment after double-unit cord blood allografts. *Blood*. 2011 Mar 24;117(12):3277-85.
- 5- Ballen K, Mendizabal AM, Cutler C et al. Phase II trial of parathyroid hormone after double umbilical cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(12):1851-1858.
- 6- Ballen KK, Spitzer TR, Yeap BY ,et al. Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13(1):82-89.
- 7- Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood*. 2013 Jul 25; 122(4):491-8.
- 8- Barker JN, Davies SM, De For T et al. Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. *Blood*. 2001 May 15;97(10):2957-61.
- 9- Barker JN, Doubrovina E, Sauter C et al. Successful treatment of EBV-associated posttransplantation lymphoma after cord blood

- transplantation using third-party EBV-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 2010;116:5045-9.
- 10-**Barker JN, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003;48:35-43.
- 11-**Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE et al. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* (2005) 105(3):1343–7.
- 12-**Barker JN, Weisdorf DJ, Wagner JE et al. Creation of a double chimera after the transplantation of umbilical-cord blood from two partially matched unrelated donors. *N Engl J Med* (2001) 344(24):1870–1.
- 13-**Barker JN, Krepski TP, DeFor TE et al. Searching for unrelated donor hematopoietic stem cell: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(5):257-60.
- 14-**Barker JN, Scaradavou A, Stevens CE et al. Combined effect of total nucleated cell dose and HLA match on transplantation outcome in 1061 cord blood recipients with hematologic malignancies. *Blood*. 2010 Mar 4;115(9):1843-9.
- 15-**Baron F, Ruggeri A, Beohou E et al. RIC versus MAC UCBT in adults with AML: A report from Eurocord, the ALWP and the CTIWP of the EBMT. *Oncotarget*. 2016 Jul 12;7(28):43027-43038.
- 16-**Bautista G, Cabrera JR, Regidor C et al. Cord blood transplants supported by co-infusion of mobilized hematopoietic stem cell from a third-party donor. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Mar;43(5):365-73.
- 17-**Beck JC, Wagner JE, DeFor TE et al. Impact of cytomegalovirus (CMV) reactivation after umbilical cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(2):215-222.
- 18-**Brown JA, Boussiotis VA. Umbilical cord blood transplantation: basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. *Clin Immunol*. 2008;127(3):286-297.
- 19-**Brown JA, Stevenson K, Kim HT et al. Clearance of CMV viremia and survival after double umbilical cord blood transplantation in adults

- depends on reconstitution of thymopoiesis. *Blood*. 2010;115(20):4111-4119.
- 20-**Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86(10): 3828-3832.
- 21-**Broxmeyer HE, Kohli L, Kim CH et al. Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 directly enhances survival/antiapoptosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and G(alpha)i proteins and enhances engraftment of competitive, repopulating stem cells. *J Leukoc Biol* (2003) 73(5):630–8.
- 22-**Broxmeyer HE, Kurtzberg J, Gluckman E et al. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. *Blood Cells*. 1991;17(2):313-329.
- 23-**Broxmeyer HE, Lee MR, Hangoc G et al. Hematopoietic stem/progenitor cells, generation of induced pluripotent stem cells, and isolation of endothelial progenitors from 21- to 23.5-year cryopreserved cord blood. *Blood*. 2011;117(18): 4773-4777.
- 24-**Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 May;86(10):3828-32.
- 25-**Broxmeyer HE, Cooper S, Hass DM et al. Experimental basis of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Nov;44(10):627-33.
- 26-**Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 May 1;89(9):4109-13.
- 27-**Broxmeyer HE, Maze R, Miyazawa K et al. The kit receptor and its ligand, steel factor, as regulators of hemopoiesis. *Cancer Cells*. 1991 Dec;3(12):480-7.
- 28-**Brunstein CG, Barker JN, Weisdorf DJ et al. Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on

- transplantation out comes in 110 adults with hematologic disease. *Blood* (2007) 110(8):3064–70.
- 29-**Brunstein CG, Cao Q, McKenna DH et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* 117(2011): 1061–1070.
- 30-**Brunstein CG, Gutman JA, Weisdorf DJ et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy: relative risks and benefits of double umbilical cord blood. *Blood* (2010) 116(22):4693–9.
- 31-**Brunstein CG, Miller JS, McKenna DH et al. Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile and clinical effect. *Blood* (2016) 127(8):1044–1051.
- 32-**Brunstein CG, Cutler CS, DeFor TE et al. Matching at Human Leukocyte Antigen-C Improved the Outcomes after Double Umbilical Cord Blood Transplantation for Recipients of Two to Four of Six Human Leukocyte Antigen-Matched Grafts. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017 Jan;23(1):126-133.
- 33-**Brunstein CG, Petersdorf EW, De For TE et al. Impact of Allele-Level HLA Mismatch on Outcomes in Recipients of Double Umbilical Cord Blood Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016 Mar;22(3):487-92.
- 34-**Burke MJ, Vogel RI, Janardan SK et al. Early lymphocyte recovery and outcomes after umbilical cord blood transplantation (UCBT) for hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant,* 17 (2011), pp. 831–840.
- 35-**Campagnoli C, Fisk N, Overton T et al. Circulating hematopoietic progenitor cells in first trimester fetal blood. *Blood.* 2000 Mar 15;95(6):1967-72.
- 36-**Campbell TB, Hangoc G, Liu Y, Pollok K, Broxmeyer HE. Inhibition of CD26 in human cord blood CD34⁺ cells enhances their engraftment of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice. *Stem Cells Dev.* 2007; 16(3):347-354.

- 37-**Canto E, Rodriguez-Sanchez JL, Vidal S. Distinctive response of naive lymphocytes from cord blood to primary activation via TCR. *J Leukoc Biol* 2003;74:998–1007.
- 38-**Castillo N, García-Cadenas I, Barba P et al. Post-thaw viable CD45⁺ cells and clonogenic efficiency are associated with better engraftment and outcomes after single cord blood transplantation in adult patients with malignant diseases. *Biol Blood Marrow Transplant*, 21 (2015), pp. 2167–2172.
- 39-**Castillo N, García-Cadenas I, García O et al. Few and nonsevere adverse infusion events using an automated method for diluting and washing before unrelated single cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Apr;21(4):682-7.
- 40-**Chakraverty R, Orti G, Roughton M et al. Impact of in vivo alemtuzumab dose before reduced-intensity conditioning and HLA-identical sibling stem cells transplantation: pharmacokinetics, GVHD, and immune reconstitution. *Blood*. 2010;116: 3080-3088.
- 41-**Chalmers IM, Janossy G, Contreras M, Navarrete C. Intracellular cytokine profile of cord and adult blood lymphocytes. *Blood*. 1998;92(1): 11-18.
- 42-**Chao NJ, Liu CX, Rooney B et al. Nonmyeloablative regimen preserves “niches” allowing for peripheral expansion of donor T-cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002; 8(5):249-256.
- 43-**Chen L, Cohen AC, Lewis DB. Impaired allogeneic activation and T-helper 1 differentiation of human cord blood naive CD4 T cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:160–71.
- 44-**Chiesa R, Gilmour K, Qasim W et al. Omission of in vivo T-cells depletion promotes rapid expansion of naïve CD4⁺ cord blood lymphocytes and restores adaptive immunity within 2 months after unrelated cord blood transplant. *Br J Haematol*, 156 (2012), pp. 656–666.

- 45-**Christopherson KWII, Hangoc G, Mantel CR, Broxmeyer HE. Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. *Science*. 2004;305(5686):1000-1003.
- 46-**Christopherson KWII, Paganessi LA, Napier S, Porecha NK. CD26 inhibition on CD34+ or lineage-human umbilical cord blood donor hematopoietic stem cells/hematopoietic progenitor cells improves long-term engraftment into NOD/SCID/Beta2 null immunodeficient mice. *Stem Cells Dev* (2007) 16(3):355–60.
- 47-**Chung B, Barbara-Burnham L, Barsky L et al. Radiosensitivity of thymic interleukin-7 production and thymopoiesis after bone marrow transplantation. *Blood*. 2001;98:1601-1606.
- 48-**Clave E, Busson M, Douay C et al. Acute graft versus- host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation. *Blood*.2009;113(25):6477-6484.
- 49-**Clave E, Lisini D, Douay C et al. Thymic function recovery after unrelated donor cord blood or T-cells depleted HLA-haploidentical stem cells transplantation correlates with leukemia relapse. *Front Immunol*. 2013;4:54.
- 50-**Cutler C, Multani P, Robbins D et al. Prostaglandinmodulated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2013; 122: 3074–3081.
- 51-**Cutler CS, Shoemaker D, Ballen KK et al. FT 1050 (16,16 dimethyl Prostaglandin E2)-enhanced umbilical cord blood accelerates hematopoietic engraftment after reduced intensity conditioning and double umbilical cord blood transplantation. *Blood*. 2011;118:653a.
- 52-**Danby R, Rocha V. Improving engraftment and immune reconstitution in umbilical cord blood transplantation. *Front Immunol*, 5 (2014), p. 68.
- 53-**De Lima M, McNiecel, Robinson SN et al. Cord-blood engraftment with exvivo mesenchymal-cell coculture. *N Engl J Med* (2012) 367(24):2305–15.

- 54-**De Lima M, McMannis J, Gee A et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone Marrow Transplant.* 2008 May;41(9):771-8.
- 55-**De Smedt M, Reynvoet K, Kerre T et al. Active form of Notch imposes T cells fate in human progenitor cells. *J Immunol.* 2002;169(6):3021-3029.
- 56-**Delaney C, Bollard CM, Shpall EJ. Cord blood graft engineering. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:S74-8.
- 57-**Eapen M, Klein J.P, Ruggeri A et al. Impact of allele-level HLA matching on outcomes after myeloablative single unit umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancy. *Blood*, 123 (2014), pp. 133–140.
- 58-**Eapen M, Rocha V, Sanz G et al. Effect of graft source on unrelated donor haemopoietic stem-cells transplantation in adults with acute leukaemia: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2010 Jul;11(7):653-60.
- 59-**Eapen M, Klein JP, Sanz GF et al. Effect of donor-recipient HLA matching at HLA A, B, C and DRB1 on outcomes after umbilical-cord blood transplantation for leukaemia and myelodysplastic syndrome: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2011 Dec;12(13):1214-21.
- 60-**Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet.* 2007 Jun 9;369(9577):1947-54.
- 61-**Eyrich M, Leiler C, Lang P et al. A prospective comparison of immune reconstitution in pediatric recipients of positively selected CD341 peripheral blood stem cells from unrelated donors vs recipients of unmanipulated bone marrow from related donors. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32(4):379-390.
- 62-**Fernández MN, Regidor C, Cabrera R et al. Unrelated umbilical cord blood transplants in adults: Early recovery of neutrophils by supportive

- co-transplantation of a low number of highly purified peripheral blood CD34+ cells from an HLA-haploidentical donor. *Exp Hematol*. 2003 Jun;31(6):535-44.
- 63-**Ferrá C, Sanz J, de la Cámara R et al. Unrelated transplantation for poor-prognosis adult acute lymphoblastic leukemia: long-term outcome analysis and study of the impact of hematopoietic graft source. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Jul;16(7):957-66.
- 64-**Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease, I: Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant*, 11 (2005), pp. 945–956.
- 65-**Fine J.P. Regression modeling of competing crude failure probabilities. *Biostatistics*, 2 (2001), pp. 85–97.
- 66-**Frassoni F, Gualandi F, Podesta M et al. Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study. *Lancet Oncol* (2008) 9(9):831–9.
- 67-**Geyer M.B, Jacobson J.S, Freedman J et al. A comparison of immune reconstitution and graft-versus-host disease following myeloablative conditioning versus reduced-toxicity conditioning and umbilical cord blood transplantation in paediatric recipients. *Br J Haematol*, 155 (2011), pp. 218–234.
- 68-**Gill J, Malin M, Sutherland J et al. Thymic generation and regeneration. *Immunol Rev*. 2003;195:28-50.
- 69-**Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989;321(17):1174-1178.
- 70-**Gluckman E, Rocha V, Arcese W et al. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp Hematol* (2004) 32(4): 397–407.

- 71-**Glucksberg H, Storb R, Fefer A et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation*, 18 (1974), pp. 295–304.
- 72-**Godfrey WR, Spoden DJ, Ge YG et al. Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cells lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood*. 2005 Jan 15;105(2):750-8.
- 73-**Godthelp BC, van Tol MJ, Vossen JM, van Den Elsen PJ. T-Cells immune reconstitution in pediatric leukemia patients after allogeneic bone marrow transplantation with T-cells-depleted or unmanipulated grafts: evaluation of overall and antigen-specific T-cells repertoires. *Blood*. 1999; 94(12):4358-4369.
- 74-**Goesling W, Allen RS, Guan X ,et al. Prostaglandin E2 enhances human cord blood stem cell xenotransplants and shows long-term safety in preclinical nonhuman primate transplant models. *Cell Stem Cell*. 2011;8(4):445-458.
- 75-**Gonzalez S, Amat L, Azqueta C et al. Factors modulating circulation of hematopoietic progenitor cells in cord blood and neonates. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Cytotherapy*. 2009;11(1):35-42.
- 76-**Gratwohl. The EBMT risk score. *Bone Marrow Transplant*, 47 (2012), pp. 749–756.
- 77-**Grewal SS, Barker JN, Davies SM, Wagner JE. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood. *Blood*. 2003 Jun 1;101(11):4233-44.
- 78-**Gul Z, Van Meter E, Abidi M et al. Low blood lymphocyte count at 30 days post-transplant predicts worse acute GVHD and survival but not relapse in a large retrospective cohort. *Bone Marrow Transplant*, 50 (2015), pp. 432–437.
- 79-**Hamza NS, Lisgaris M, Yadavalli G et al. Kinetics of myeloid and lymphocyte recovery and infectious complications after unrelated umbilical cord blood versus HLA-matched unrelated donor allogeneic transplantation in adults. *Br J Haematol*, 124 (2004), pp. 488-498.

- 80-**Hanley P, Leen A, Gee AP et al. Multi-virus-specific T-cells Therapy for patients after hematopoietic stem cells and cord blood transplantation [American Society of Hematology abstract]. *Blood* 2013;122.
- 81-**Hiramine C, Hojo K, Matsumoto H. Abnormal distribution of T cells subsets in the thymus of cyclosporin A (CsA)-treated mice. *Thymus*.1988;11(4):243-252.
- 82-**Iacobelli S. Suggestions on the use of statistical methodologies in studies of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 48 (Suppl 1) (2013), pp. S1–S37.
- 83-**Jacobson CA, Turki AT, McDonough SM et al. Immune reconstitution after double umbilical cord blood stem cells transplantation: comparison with unrelated peripheral blood stem cells transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 18 (2012), pp. 565–574.
- 84-**Jaroscak J, Goltry K, Smith A et al. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with exvivo- expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the Aastrom Replicell System. *Blood* (2003) 101(12):5061–7.
- 85-**Jimenez A, Fung HC, Christopherson KWII. Cellular therapies supplement: strategies for improving transplant efficiency in the context of cellular therapeutics. *Transfusion* (2011) 51(Suppl4):125S–37S.
- 86-**Jiménez M, Martínez C, Ercilla G et al. Reduced-intensity conditioning regimen preserves thymic function in the early period after hematopoietic stem cells transplantation. *Exp Hematol*. 2005;33(10):1240-1248.
- 87-**Juliusson G, Theorin N, Karlsson K et al. Subcutaneous alemtuzumab vs ATG in adjusted conditioning for allogeneic transplantation: influence of Campath dose on lymphoid recovery, mixed chimerism and survival. *Bone Marrow Transplant*. 2006 Mar;37(5):503-10.
- 88-**Kanda J, Chiou LW, Szabolcs P et al. Immune recovery in adult patients after myeloablative dual umbilical cord blood, matched sibling, and matched unrelated donor hematopoietic cells transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012 Nov;18(11):1664-1676.

- 89-**Kaplan E.L, Meier P Nonparametric estimation from incomplete observations J Am Stat Assoc, 53 (1958), pp. 457–481.
- 90-**Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Weisenburger DD. Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells. Exp Hematol. 1986 Mar;14(3):192-6.
- 91-**Klein AK, Patel DD, Gooding ME et al. T-cells recovery in adults and children following umbilical cord blood transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2001;7(8):454-466.
- 92-**Knudtzon S. Colony growth of human leukemic peripheral blood cells in vitro. Blood. 1974 Mar;43(3):357-61.
- 93-**Kohli-Kumar M, Shahidi NT, Broxmeyer HE et al. Haemopoietic stem/progenitor cells transplant in Fanconi anaemia using HLA-matched sibling umbilical cord blood cells. Br J Haematol. 1993; 85(2):419-422.
- 94-**Komanduri KV, St. John LS, de Lima M et al. Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized Biol Blood Marrow Transplant 18:565-574, 2012.Blood. 2007 Dec 15;110(13):4543-51.
- 95-**Kosugi A, Zuniga-Pflucker JC, Sharrow SO, Kruisbeek AM, Shearer GM. Effect of cyclosporin A on lymphopoiesis. II. Developmental defects of immature and mature thymocytes in fetal thymus organ cultures treated with cyclosporin A. J Immunol. 1989; 143(10):3134-3140.
- 96-**Kottaridis PD, Milligan DW, Chopra R et al. In vivo CAMPATH-1H prevents graft-versus-host disease following nonmyeloablative stem cells transplantation. Blood. 2000;96:2419-2425.
- 97-**Krenger W, Holländer GA. The immunopathology of thymic GVHD. Semin Immunopathol. 2008;30(4):439-456.
- 98-**Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated donors [see comments]. N Engl J Med 1996; 335: 157–66.
- 99-**Laporte JP, Gorin NC, Rubinstein P et al. Cord-blood transplantation from an unrelated donor in an adult with chronic myelogenous leukemia. N Engl J Med. 1996 Jul 18;335(3):167-70.

- 100-** Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C et al. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood* (2000) 95(3):75.
- 101-** Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med*, 351 (2004), pp. 2265–2275.
- 102-** Levac K, Karanu F, Bhatia M. Identification of growth factor conditions that reduce ex vivo cord blood progenitor expansion but do not alter human repopulating cell function in vivo. *Haematologica* (2005) 90(2):166–72.
- 103-** Lindemans CA, Chiesa R, Amrolia PJ et al. Impact of thymoglobulin prior to pediatric unrelated umbilical cord blood transplantation on immune reconstitution and clinical outcome. *Blood*, 123 (2014), pp. 126–132.
- 104-** Liu H, Rich ES, Godley L et al. Reduced-intensity conditioning with combined haploidentical and cord blood transplantation results in rapid engraftment, low GVHD, and durable remissions. *Blood* (2011) 118(24):6438–45.
- 105-** Lucchini G, Perales M.A, Veys P. Immune reconstitution after cord blood transplantation: peculiarities, clinical implications and management strategies. *Cytotherapy*, 17 (2015), pp. 711–722.
- 106-** Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR et al. Age, thymopoiesis, and CD41 T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med*. 1995 Jan 19;332(3):143-9.
- 107-** Mallhi KK, Smith AR, DeFor TE et al. Allele-Level HLA Matching Impacts Key Outcomes Following Umbilical Cord Blood Transplantation for Inherited Metabolic Disorders. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017 Jan;23(1):119-125.
- 108-** Mayani H, Lansdorp PM. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells*. 1998;16(3):153-65.
- 109-** McCarthy DM, Goldman JM. Transfusion of circulating stem cells. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1984;20(1):1-24.

- 110-** Mehta RS, Rezvani K. Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. *Virulence*. 2016 Nov 16;7(8):901-916.
- 111-** Micklethwaite KP, Savoldo B, Hanley PJ et al. Derivation of human T lymphocytes from cord blood and peripheral blood with antiviral and antileukemic specificity from a single culture as protection against infection and relapse after stem cells transplantation. *Blood* 2010;115:2695-703.
- 112-** Mold J.E, Venkatasubrahmanyam S, Burt T.D et al. Fetal and adult hematopoietic stem cells give rise to distinct T cells lineages in humans. *Science*, 330 (2010), pp. 1695–1699.
- 113-** Moretta A, Maccario R, Fagioli F et al. Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. *Exp Hematol*. 2001 Mar;29(3):371-9.
- 114-** Moscardó F, Sanz J, Carbonell F et al. Effect of CD8⁺ cells content on umbilical cord blood transplantation in adults with hematological malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*, 20 (2014), pp. 1744–1750.
- 115-** Nakatani K, Imai K, Shigeno M et al. Cord blood transplantation is associated with rapid B-cell neogenesis compared with BM transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2014 Sep;49(9):1155-61.
- 116-** Niehues T, Rocha V, Filipovich AH, et al. Factors affecting lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children-a Eurocord analysis. *Br J Haematol*. 2001;113:42-48.
- 117-** Okada M, Yoshihara S, Taniguchi K et al. Intra- bone marrow transplantation of unwashed cord blood using reduced-intensity conditioning treatment: a phase I study. *Biol Blood Marrow Transplant* (2012) 18 (4):633–9.
- 118-** Oran B, Hosing CM, Kebriaei P, Rezvani K, Parmar S, Shah N et al. Ex Vivo fucosylation of cord blood accelerates neutrophil and platelet engraftment. *Blood* 2013; 122: 691.

- 119-** Oran B, Cao K, Saliba RM et al. Better allele-level matching improves transplant-related mortality after double cord blood transplantation. *Haematologica*. 2015 Oct;100(10):1361-70.
- 120-** Parkman R, Cohen G, Carter SL et al. Successful immune reconstitution decreases leukemic relapse and improves survival in recipients of unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12(9):919-927.
- 121-** Pascal L, Tucunduva L, Ruggeri A et al. Impact of GAT-containing reduced-intensity conditioning after single- or double-unit allogeneic cord blood transplantation. *Blood*, 126 (2015), pp. 1027–1032.
- 122-** Peggs KS. Role of MabCampath in allogeneic transplantation. *Ann Hematol*. 2004;83(Suppl 1):S66-S68.
- 123-** Perales MA, Goldberg JD, Yuan J et al. Recombinant human interleukin-7 (CYT107) promotes T-cells recovery after allogeneic stem cells transplantation. *Blood*. 2012 Dec 6;120(24):4882-91.
- 124-** Poli F, Sirchia SM, Scalamogna M et al. Detection of maternal DNA in human cord blood stored for allotransplantation by a highly sensitive chemiluminescent method. *J Hematother*. 1997 Dec;6(6):581-5.
- 125-** Politikos I, Kim HT, Nikiforow S et al. IL-7 and SCF Levels Inversely Correlate with T Cell Reconstitution and Clinical Outcomes after CordBlood Transplantation in Adults. *PLoS One*. 2015 Jul 15;10(7):e0132564.
- 126-** Ponce DM, Eapen M, Sparapani M et al. In vivo T cells depletion with myeloablative regimens on outcomes after cord blood transplantation for acute lymphoblastic leukemia in children. *Biol Blood Marrow Transplant*, 21 (2015), pp. 2173–2179.
- 127-** Ponce DM, Gonzales A, Lubin M et al. Graft-versus-host disease after double-unit cord blood transplantation has unique features and an association with engrafting unit-to-recipient HLA match. *Biol Blood Marrow Transplant*, 19 (2013), pp. 904–911.
- 128-** Ponce DM, Hilden P, Devlin SM et al. High disease-free survival with enhanced protection against relapse after double-unit cord blood

- transplantation when compared with T cells–depleted unrelated donor transplantation in patients with acute leukemia and chronic myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*, 21 (2015), pp.1985–1993.
- 129-** Ponce DM, Sauter C, Devlin S et al. A novel reduced-intensity conditioning regimen induces a high incidence of sustained donor-derived neutrophil and platelet engraftment after double unit cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:799-803.
- 130-** Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant*, 15 (1995), pp. 825–828.
- 131-** Rénard C, Barlogis V, Mialou V et al. Lymphocyte subset reconstitution after unrelated cord blood or bone marrow transplantation in children. *Br J Haematol*. 2011 Feb;152(3):322-30.
- 132-** Risdon G, Gaddy J, Broxmeyer HE. Allogeneic responses of human umbilical cord blood. *Blood Cells* 1994;20:566–70.
- 133-** Risdon G, Gaddy J, Stehman FB, Broxmeyer HE. Proliferative and cytotoxic responses of human cord blood T lymphocytes following allogeneic stimulation. *Cells Immunol*. 1994;154(1):14-24.
- 134-** Robinson SN, Simmons PJ, Thomas MW et al. Ex vivo fucosylation improves human cord blood engraftment in NOD-SCID IL-2Rg(null) mice. *Exp Hematol*. 2012;40(6):445-456.
- 135-** Robinson WA, Kurnick JE, Pike BL. Colony growth of human leukemic peripheral blood cells in vitro. *Blood*. 1971 Oct;38(4):500-8.
- 136-** Rocha V, Cornish J, Sievers EL et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood*. 2001 May 15;97(10):2962-71.
- 137-** Rocha V, Labopin M, Ruggeri A et al. Unrelated cord blood transplantation: outcomes after single-unit intrabone injection compared with double-unit intravenous injection in patients with hematological malignancies. *Transplantation* (2013) 95(10):1284–91.

- 138-** Rocha V, Labopin M, Sanz G et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med*, 351 (2004), pp. 2276–2285.
- 139-** Rocha V, Wagner JE, Sobocinski KA et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cells Sources. *N Engl J Med*. 2000 Jun 22;342(25):1846-54.
- 140-** Roux E, Dumont-Girard F, Starobinski M et al. Recovery of immune reactivity after T-cell depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity. *Blood*. 2000;96(6):2299-2303.
- 141-** Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med*. 1998 Nov 26;339(22):1565-77.
- 142-** Ruggeri A, Peffault de Latour R, Carmagnat M, et al. Outcomes, infections, and immune reconstitution after double cord blood transplantation in patients with high-risk hematological diseases. *Transpl Infect Dis* (2011) 13(5):456–65.
- 143-** Saglio F, Berger M, Vassallo E et al. Intrabone cord blood hematopoietic stem cell transplantation in a subset of very high-risk pediatric patients: a safety and feasibility pilot study. *J Pediatr Hematol Oncol* (2012) 34(5):359–63.
- 144-** Sairafi D, Mattsson J, Uhlin M, Uzunel M. Thymic function after allogeneic stem cells transplantation is dependent on graft source and predictive of long term survival. *Clin Immunol*. 2012;142(3):343-350.
- 145-** Saliba RM, Rezvani K, Leen A et al. General and Virus-Specific Immune Cells Reconstitution after Double Cord Blood Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Jul;21(7):1284-90.
- 146-** Sanz J, Boluda, Martín C et al. Single-unit umbilical cord blood transplantation from unrelated donors in patients with hematological malignancy using busulfan, thiotepa, fludarabine and GAT as

- myeloablative conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant*, 47 (2012), pp. 1287–1293.
- 147-** Saudemont A, Madrigal JA. Immunotherapy after hematopoietic stem cell transplantation using umbilical cord blood-derived products. *Cancer Immunol Immunother*. 2016 Jun 6.
- 148-** Sauter C, Abboud M, Jia X et al. Serious infection risk and immune recovery after double-unit cord blood transplantation without antithymocyte globulin. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:1460-71.
- 149-** Savani BN, Mielke S, Rezvani K et al. Absolute lymphocyte count on day 30 is a surrogate for robust hematopoietic recovery and strongly predicts outcome after T cell–depleted allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 13 (2007), pp. 1216–1223.
- 150-** Scaradavou A, Smith KM, Hawke R et al. Cord blood units with low CD34⁺ cells viability have a low probability of engraftment after double-unit transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 16 (2010), pp. 500–508.
- 151-** Sebrango A, Vicuna I, de Laiglesia A et al. Haematopoietic transplants combining a single unrelated cord blood unit and mobilized haematopoietic stem cells from an adult HLA-mismatched third party donor. Comparable results to transplants from HLA-identical related donors in adults with acute leukaemia and myelodysplastic syndromes. *Best Pract Res Clin Haematol* (2010) 23(2):259–74.
- 152-** Seggewiss R, Einsele H. Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood*. 2010;115:3861-3868.
- 153-** Shields LE, Bryant EM, Easterling TR, Andrews RG. Fetal liver cells transplantation for the creation of lymphohematopoietic chimerism in fetal baboons. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1157–60.
- 154-** Shpall EJ, Quinones R, Giller R et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant* (2002) 8 (7):368–76.

- 155-** Shulman H.M, Sullivan K.M, Weiden P.L et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man: a long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med*, 69 (1980), pp. 204–217.
- 156-** Somers J.A, Brand A, van Hensbergen Y et al. Double umbilical cord blood transplantation: a study of early engraftment kinetics in leukocyte subsets using HLA-specific monoclonal antibodies. *Biol Blood Marrow Transplant*, 19 (2013), pp. 266–273.
- 157-** Sotnezova EV, Andreeva ER, Grigoriev AI, Buravkova LB. Ex Vivo Expansion of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells from Umbilical Cord Blood. *Acta Naturae*. 2016 Jul-Sep;8(3):6-16.
- 158-** Sportès C, Hakim FT, Memon SA et al. Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cells subsets. *J Exp Med*. 2008 Jul 7;205(7):1701-14.
- 159-** Takahashi S, Iseki T, Ooi J, Tomonari A et al. Single-institute comparative analysis of unrelated bone marrow transplantation and cord blood transplantation for adult patients with hematologic malignancies. *Blood*. 2004 Dec 1;104(12):3813-20. Epub 2004 Jul 27.
- 160-** Talvensaari K, Clave E, Douay C et al. A broad T-cells repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cells transplantation. *Blood*. 2002;99(4):1458-1464.
- 161-** Tedeschi SK, Jagasia M, Engelhardt B.G et al. Early lymphocyte reconstitution is associated with improved transplant outcome after cord blood transplantation. *Cytotherapy*, 13 (2011), pp. 78–82.
- 162-** Terakura S, Atsuta Y, Tsukada N et al. Comparison of outcomes of 8/8 and 7/8 allele-matched unrelated bone marrow transplantation and single-unit cord blood transplantation in adults with acute leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*, 22 (2016), pp. 330–338.
- 163-** Terakura S, Azuma E, Murata M et al. Hematopoietic engraftment in recipients of unrelated donor umbilical cord blood is affected by the

- CD34⁺ and CD8⁺ cells doses. *Biol Blood Marrow Transplant*, 13 (2007), pp. 822–830.
- 164-** Thomson BG, Robertson KA, Gowan D et al. Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood*. 2000;96:2703-2711.
- 165-** Trenado A, Charlotte F, Fisson S et al. Recipient-type specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus leukemia. *J Clin Invest* 2003;112:1688–96.
- 166-** Tung SS, Parmar S, Robinson SN, De Lima M, Shpall EJ. Ex vivo expansion of umbilical cord blood for transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010 Jun;23(2):245-57.
- 167-** Uhlin M, Sairafi D, Berglund S et al. Mesenchymal stem cells inhibit thymic reconstitution after allogeneic cord blood transplantation. *Stem Cells Dev*. 2012;21(9):1409-1417.
- 168-** van Heijst JW, Ceberio I, Lipuma LB et al. Quantitative assessment of T cells repertoire recovery after hematopoietic stem cells transplantation. *Nat Med*. 2013;19(3):372-377.
- 169-** Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC ,et al. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Oct 11;91(21):9857-60.
- 170-** Verneris MR, Brunstein CG, Barker J et al. Relapse risk after umbilical cord blood transplantation: enhanced graft- versus-leukemia effect in recipients of 2 units. *Blood* (2009) 114(19):4293–9.
- 171-** Wagner JE, Broxmeyer HE, Byrd RL et al. Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: analysis of engraftment. *Blood*. 1992;79(7):1874-1881.
- 172-** Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, Broxmeyer HE, Gluckman E. Allogeneic sibling umbilical cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet*. 1995;346(8969):214-219.
- 173-** Walker CM, van Burik JA, De For TE, Weisdorf DJ. Cytomegalovirus infection after allogeneic transplantation: comparison of cord blood with

peripheral blood and marrow graft sources. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13(9): 1106-1115.

- 174-** Weinberg K, Blazar BR, Wagner JE ,et al. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation. *Blood.* 2001;97(5):1458-1466.