



UNIVERSIDAD AUSTRAL  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

TRASPLANTE HEMATOPOYÉTICO. IMPACTO DE  
LAS VARIABLES CLÍNICAS E INMUNOGENÉTICAS  
EN LA MORTALIDAD

---

Tesis Doctoral  
Médico Mariano Berro  
Año 2019

UNIVERSIDAD AUSTRAL  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

---

Título: Trasplante hematopoyético. Impacto de las variables clínicas e inmunogenéticas en la mortalidad.

Autor: Médico Mariano Berro

Año: 2019

Lugar de realización:

Instituto de Investigación Anthony Nolan, Londres, Reino Unido

Unidad de Trasplante hematopoyético, Hospital Universitario Austral

Laboratorio Inmunogenética Universidad Austral, Pilar, Argentina,

Laboratorio de Genética Hematológica, Instituto de Medicina Experimental (IMEX-CONICET)/ Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina

Directores:

Prof. Gustavo Kusminsky

Dra. Carolina Belli

## RESUMEN

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) es un procedimiento empleado en el tratamiento de enfermedades oncohematológicas, así como de determinadas condiciones no neoplásicas. Se encuentra asociado a múltiples complicaciones. Las variables clínicas e inmunogenéticas del paciente, el origen de los progenitores y las características del procedimiento *per se* influyen en el resultado y en la aparición de estas complicaciones. La mortalidad libre de enfermedad (MLE), indicativa de la mortalidad relacionada al procedimiento, puede variar desde 1-2%, para ciertos trasplantes autólogos, hasta el 50%, para algunos trasplantes alogénicos con donante no relacionado (NR). El factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) es una citoquina pleiotrópica con múltiples funciones y un efecto dual en el contexto del trasplante de CPH: en las etapas tempranas predomina el fenómeno inmunosupresor, mientras que, en las etapas tardías es el pro-fibrótico. Existen dos polimorfismos de secuencia única (SNP) el c.29C>T (+29) y el c.74G>C (+74) en el gen *TGFBI*, localizados en región que codifica para el péptido señal, que afectarían su proceso de secreción.

En el presente trabajo se evaluaron diferentes estudios de cohorte retrospectivos-prospectivos de TCPH autólogo y alogénico. Las variables clínicas examinadas fueron: sexo, edad, comorbilidades según el *score* de comorbilidades específico de trasplante (HCT-CI), patología de base y *status* pre-trasplante, tipo de donante (relacionado o NR), regímenes de acondicionamiento e inmunosupresión y fuente de CPH. Los SNP +29 y +74 del gen *TGFBI* se analizaron mediante PCR alelo-específica en muestras de pacientes (y respectivos donantes) sometidos a trasplante alogénico relacionado y NR.

Los métodos estadísticos más utilizados para evaluar los eventos tiempo-dependientes fueron Kaplan-Meier (Mantel-Cox) y test de log-rank para supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la prueba de Gray para MLE y recaída. La independencia de las variables se determinó aplicando la regresión de Cox (SG y SLE) y el método de Fine-Gray (MLE y recaída), expresado como *hazard ratio* (HR) con intervalos de confianza (IC) 95%. Las variables categóricas fueron evaluadas mediante la prueba exacta de Fisher o  $\chi^2$  (univariado) y regresión logística (multivariado).

En un análisis de complejidad creciente, inicialmente se validó el *score* HCT-CI en un estudio de cohorte retrospectiva de 1730 TCPH autólogos realizados en Argentina. Los pacientes con HCT-CI  $\geq 3$  tuvieron un incremento significativo e independiente de la MLE (HCT-CI  $\geq 3$  HR 3,0, IC 95% 1,4-4,5). Además, el *score* se asoció de manera

independiente con los eventos de morbilidad temprana analizados: requerimiento de asistencia respiratoria mecánica, vasopresores y diálisis.

Posteriormente, se amplió la serie a 2068 trasplantes y se homogeneizó la cohorte incluyendo únicamente Mieloma Múltiple y Linfomas como patologías de base con el objetivo de desarrollar un nuevo sistema de puntaje multifactorial para predecir el riesgo de MLE. Los factores independientes incluidos fueron: edad (55-64 y  $\geq 65$  años), sexo masculino, HCT-CI  $\geq 3$  y patología de base (Linfoma de Hodgkin y no Hodgkin). Al agrupar los pacientes en riesgo bajo (puntaje 0-1), intermedio (2-3), alto (4) y muy alto ( $\geq 5$ ) se evidenció una asociación significativa con los eventos de morbilidad temprana y con la MLE (riesgo bajo ref., HR, IC 95%; intermedio 2,2, 1,2-3,9; alto 6,4, 3,3-12,2; muy alto 14, 6,9-28,2). Además, el nuevo sistema logró predecir la SG (riesgo bajo ref. HR, IC 95%; intermedio 1,4, 1,1-1,8; alto 2,5, 1,8-3,6; muy alto 3,9, 2,6-6,1).

En el escenario del TCPH alogénico, al incorporar al donante el procedimiento se vuelve más complejo. La incidencia de enfermedad injerto contra huésped (EICH) aguda grados (G) II-IV se vio incrementada con el uso de esquemas mieloablativos al igual que con donantes NR, mientras que, la fuente de CPH de sangre periférica aumentó la incidencia de EICH crónica. A su vez los donantes NR y el HCT-CI  $\geq 1$  se asociaron con mayor riesgo de MLE (HR 2,6, IC 95% 1,4-5,1; HR 3,1, IC 95% 1,5-6,6, respectivamente) y menor SG (HR 1,8, IC 95% 1,2-2,7; HR 2,1, IC 95% 1,3-3,3, respectivamente). En relación a la patología de base, los pacientes que recibieron un trasplante en estadio tardío presentaron un incremento significativo de la tasa de recaída (HR 2,4, IC 95% 1,2-4,6) con una reducción en la SG (HR 1,9, IC 95% 1,2-3,1). Tras el análisis de la casuística multicéntrica ampliada de TCPH alogénico en 137 pacientes mayores de 50 años, se confirmó la importancia del HCT-CI  $\geq 3$  (HR 2,1, IC 95% 1,01-4,3) y del sexo masculino (HR 2,3, IC 95% 1,07-5,0) en la predicción de la MLE.

En dos cohortes independientes de TCPH alogénico, una de donante relacionado (N=245) y otra de donante NR (N=686), se evaluó el impacto de los SNP +29 y +74 del gen *TGFBI*. El SNP +74 no influyó en ningún evento clínico analizado. Los receptores +29 CC presentaron una reducción de la EICH aguda y los G II-IV en la serie de trasplante relacionado (sub-análisis de acondicionamientos mieloablativos: HR 5,6, IC 95% 1,1-30,0 y 5,5, 1,1-27,0 respectivamente) y NR (HR, 1,5, IC 95% 0,9-2,5 y 2,1, 1,1-4,5, respectivamente). El genotipo de los donantes no influyó en los trasplantes NR posiblemente debido al uso de depleción linfocitaria. Mientras que, en los trasplantes relacionados con acondicionamientos mieloablativos, el alelo +29 C marcó una

tendencia a desarrollar menos EICH aguda y se asoció de manera significativa con más EICH crónica extensa (CC vs. TC/TT HR 9,0 IC 95% 1,3-62). A su vez, los donantes +29 CC mostraron una reducción independiente de la tasa de recaída (HR 2,5, IC 95% 1,2-4,9) y una mayor SG (5 años 50% vs. 69%,  $p=0,04$ , HR 1,94, IC 95% 0,99-3,8).

Los pacientes +29 CC presentaron un incremento significativo de la MLE con el uso de acondicionamientos mieloablativos en ambas cohortes (relacionado HR 4,2, IC 95% 1,1-15,2; NR HR 1,9, IC 95% 1,2-2,9). La asociación con la MLE fue independiente de las variables clínicas como la edad, sexo e, incluso, de las comorbilidades (evaluadas únicamente en los relacionados). En el caso de los NR el aumento de la MLE implicó una reducción de la SG (HR 1,5, IC 95% 1,0-2,2).

Los estudios *in vitro* evidenciaron que los linfocitos T regulatorios (Tregs) estimulados aumentan la expresión de TGF- $\beta$ 1 en su membrana con un máximo a las 48-72hs. Además, los Tregs +29 CC mostraron mayor capacidad inmunosupresora que los TC y TT (92% vs. 80% vs. 70%,  $p=0,013$ ). En cuanto a los estudios *in vivo*, se identificó una cinética de reconstitución inmune de los Tregs característica según el procedimiento, con un pico entre los días 21 y 28 post trasplante alogénico, sin incremento significativo en la expresión de TGF- $\beta$ 1 en membrana. Para finalizar, no se comprobaron diferencias significativas en los niveles séricos de TGF- $\beta$ 1 según los SNP +29 y +74 en muestras pre-trasplante (estado quiescente). Entonces, se postula que el SNP +29 incrementaría la secreción de TGF- $\beta$ 1 en los Tregs ante estímulos activadores.

En conclusión, el éxito del trasplante de CPH depende de factores clínicos e inmunogenéticos. Los riesgos se incrementan con variables clínicas propias del paciente, como las comorbilidades, la edad y el sexo; de la patología de base y su *status* pre-trasplante; del tipo de donante, en el caso de los alogénicos, y de variantes inmunogenéticas como el SNP +29C>T del gen *TGFB1*. Conocer estos factores puede ayudar a una mejor selección de los pacientes y de sus donantes, así como a definir estrategias de acondicionamiento e inmunosupresión adaptadas al riesgo individual con el objetivo de disminuir los índices de morbi-mortalidad asociados al procedimiento.

## **ABSTRACT**

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a potential curative option for several neoplastic and non-neoplastic diseases. Clinical and immunogenetics variables of patient and donor as well as procedure characteristics play a role in transplant outcomes. Non-relapse mortality (NRM) after transplant can be as low as 1-2% for certain autologous transplant and above 50% for some allogeneic procedures with unrelated donor (UD). Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) is a pleiotropic cytokine with a dual effect in the allogeneic HSCT. Early after transplant high TGF- $\beta$ 1 levels are associated with an immunosuppressive scenario, whereas the pro-fibrotic properties prevail at later phases. Single nucleotide polymorphisms (SNP) c.29C>T (+29) and c.74G>C (+74) of *TGFBI* gene may affect the secretion process and, therefore, the cytokine effects.

In order to evaluate the impact of clinical and immunogenetics variables, several retrospective-prospective autologous and allogeneic transplant cohorts were evaluated. Clinical variables analysed were age, sex, comorbidities according to hematopoietic cell transplant-comorbidity index (HCT-CI score), disease, stage, type of donor (sibling and UD), conditioning, immunosuppression and stem cell source. *TGFBI* SNP were analysed with single specific primer PCR in two different allogeneic cohorts (sibling and UD).

Main univariate statistical analyses were Kaplan-Meier (Mantel-Cox) and log-rank test for overall survival (OS) and disease free survival (DFS) and Gray's test for NRM and relapse. Multivariate analyses were Cox regression (OS and DFS) and Fine-Gray (NRM and relapse) expressed as hazard ratio (HR) with their respective 95% confidence interval (CI). Categorical variables were analysed with Fisher exact test and Chi<sup>2</sup> (univariate) and logistic regression (multivariate).

Starting with the simplest procedure the applicability of the HCT-CI score was validated in an independent autologous transplant cohort with 1730 patients performed in Argentina. Patients with HCT-CI  $\geq 3$  had an independent significant increase in NRM (HR, 95% CI for score  $\geq 3$  vs. 0-2: 3.0, 1.4-4.5). Early morbidity events (oro-thraqueal intubation, vasopressor and dialysis) were significantly associated with HCT-CI.

To develop a new score that combines HCT-CI with other clinical variables associated with NRM, the cohort was enlarged to 2068 transplant, and homogenised including only multiple myeloma and lymphoma. Independent variables included were age (55-64 and  $\geq 65$  years), male sex, HCT-CI  $\geq 3$  and disease (Hodgkin and Non Hodgkin lymphoma).

Patients were grouped as low (score 0-1), intermediate (score 2-3), high (score 4) and very high risk (score  $\geq 5$ ). A significant association was found with the three early morbidity outcomes and NRM (low risk: ref., HR, 95% CI; intermediate 2.2, 1.2-3.9; high 6.4, 3.3-12.2; very high 14, 6.9-28.2). Additionally, the new score predicted long term OS (low risk: ref., HR, 95% CI; intermediate 1.4, 1.1-1.8, high 2.5, 1.8-3.6; very high 3.9, 2.6-6.1).

Due to the incorporation of a second party, the donor, the risks are increased considerably after allogeneic transplant. Myeloablative regimes were associated with a higher incidence of grades II-IV acute graft-versus-host disease (GVHD) as well as with UD, while the use of peripheral blood stem cells increased the risk for chronic GVHD. NRM was significantly higher for patients with HCT-CI  $\geq 1$  (HR 3.1, 95% CI 1.5-6.6) and UD transplants (HR 2.6, 95% CI 1.4-5.1) with the subsequent decrease in OS (HR 2.1, 95% CI 1.3-3.3 and HR 1.8, 95% CI 1.2-2.7, respectively). Regarding the disease, patients transplanted in late stage had a significant increase in relapse rate (HR 2.4, 95% CI 1.2-4.6) with a lower OS (HR 1.9, 95% CI 1.2-3.1). The importance of comorbidities was confirmed in a multicentre elderly patients ( $\geq 50$  years) cohort analysis (N=137). HCT-CI score  $\geq 1$  was significantly associated with higher NRM (HR 2.1, 95% CI 1.01-4.3), similar to male patients (HR 2.3, 95% CI 1.07-5.0).

*TGFBI* SNP +29 and +74 were evaluated in two independent cohorts, sibling (N=245) and UD (N=686). SNP +74 was not associated with any clinical event. Recipients with +29 CC genotype were associated with a reduction in overall aGVHD and GII-IV aGVHD incidences after myeloablative sibling (HR, 95% CI 5.6, 1.1-30.1 and 5.5, 1.1-27.0 respectively) and UD transplant (HR, IC 95% 1.5, 0.9-2.5 y 2.1, 1.1-4.5, respectively). Donor genotype did not affect UD outcomes. This lack of effect was probably due to the T cell depletion universally used in this setting. After myeloablative sibling donor, the presence of the C allele in SNP +29 was associated with a trend towards a lower aGVHD incidence and a significant increase in the extensive chronic GVHD rate (CC vs. TC/TT HR 9.0, 95% CI 1.3-30.0). Moreover, +29 CC donors were associated with a lower relapse rate (HR 2.5, 95% CI 1.2-4.9) and a higher OS (5 years 50% vs. 69%,  $p=0.04$ , HR 1.94, IC 0.99-3.8).

After myeloablative transplant, +29 CC recipients were significantly associated with a higher NRM in both sibling (HR 1.2, 95% CI 1.1-15.2) and UD (HR 1.9, 95% CI 1.2-2.9), and was independent of other clinical variables as age, sex, disease and comorbidities (this variable only included in sibling donors). After UD transplant, +29

CC recipients showed a significant reduction in OS (5 years 29% CC vs. 40% TC vs. 46% TT,  $p=0.03$ , HR 1.5, 95% CI 1.0-2.2).

*In vitro* analysis showed that activated regulatory T cell (Tregs) increased TGF- $\beta$ 1 membrane expression, with a peak at 48-72hs. Moreover, +29 CC Tregs had a higher immunosuppression capacity compared with TC and TT (92% vs. 80% vs. 70%,  $p=0.013$ ). Regarding *in vivo* assays, Tregs immune reconstitution was identified, with a peak after allogeneic transplants between day +21 and +28. These lymphocytes, however, did not increased TGF- $\beta$ 1 membrane expression in this scenario. Unstimulated TGF- $\beta$ 1 serum level, measured in 434 recipients and 546 donors of UD transplant, were not significantly affected by +29 SNP genotype. We hypothesised that +29 SNP may affect the secretion process only after T cells stimulation.

In conclusion, HSCT outcome depends on different clinical and immunogenic variables. The risks are increased with recipient variables like the presence of comorbidities, age and sex; disease variables like status; donor variables especially the relationship with the recipient and several immunogenic variables including +29C>T *TGFB1* SNP. Understanding these factors can help physicians to adjust patient and donor selection criteria and define the best conditioning and immunosuppressant regimen in order to improve transplant outcomes.



## Agradecimientos

A los subsidios otorgados para el desarrollo de este proyecto: beca RAICES del Ministerio de Ciencia y Tecnología, beca Dr Argento de la Sociedad Argentina de Trasplante y beca Florencio Fiorini.

Al Grupo Argentino de Trasplante de Médula Ósea que colaboró en los diferentes trabajos multicéntricos.

A aquellas personas que participaron en mi educación, en especial a partir de los últimos años de secundaria cuando empezó a “picar el bichito” de la investigación, la carrera de medicina, la residencia de clínica médica y la de hematología.

A Alejandro Madrigal que me abrió las puertas del Anthony Nolan, una usina de pensamiento donde aprendí lo que es el método científico.

A mis compañeros y amigos del Anthony Nolan que me enseñaron los primeros pasos en la investigación, en especial a Neema M, a Daniel FT y a Bronwen S.

Al grupo de terapia génica de la Universidad Austral que me ayudaron a no claudicar, manteniendo la mecha encendida, en especial a Guillermo Mazzolini, Mariana Malvichini, Mariana Garcia y Juan Bayo.

A Virginia Palau, en quien encontré un par con quien pudimos darnos mutua colaboración para que ambos doctorados tomaran forma.

A mis compañeros y amigos del servicio de hematología con quienes compartimos todos los días mucho más que la atención de los pacientes, José Trucco, Inés Paganini, Susana Beláustegui, Paulo Colimodio, María Esther Aris Cancela, Vivi, Laura, Lulo, Ivana, Lia y muy especialmente a María Marta Rivas.

A Carolina Belli que a fuerza de insistencia, paciencia y dedicación ordenó las ideas que daban vuelta en la cabeza para que se plasmaran correctamente.

A Gustavo Kusminsky. No se puede resumir en unos pocos renglones lo que significa para mí. Mucho más que un jefe, sos un padre en la medicina. Quizás en palabras de tu “jefe” se pueda expresar un poco lo que siento. Sánchez Avalos me dijo una vez que un jefe es quien te invita a recorrer juntos un camino. Gracias Gus.

A mis suegros por regalarme a Clara y acompañarnos tanto en todos estos años. Su ayuda en todo sentido fue muy importante para este logro.

A mis viejos. Gracias por darme todo lo que me dieron. Empezando por la vida y siguiendo por la fe y los 4 hermanos. Fueron y serán tremendos ejemplos de vida. Y si de una tesis estamos hablando recuerdo como si fuera hoy las incontables tardes de papá en el escritorio en Bella Vista con su máquina de escribir (y luego PC) las innumerables hojas del verdadero PhD.

A mi familia. Son el motor de mi vida, Juani, Anuchi, Alfon e Ine. Clara, “Flaca”, gracias por estar siempre al lado mío. La felicidad de ustedes es mi felicidad.

Agradezco a Dios, a quien descubro cada día más en la inmensidad de Su creación. Estudiar tanto una molécula tan chiquita, sus múltiples vías de acción, señales y efectos y entender que Tu mano creadora es infinita.

## **Producción científica**

A lo largo de esta tesis doctoral se fueron generando los siguientes trabajos científicos

### **Publicaciones en revistas indexadas**

1. Berro M, Mayor N, Maldonado-Torres H, et al. Association of functional polymorphism of the transforming growth factor B1 gene with survival and graft-versus-host disease after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*, 2010;95:276-83.
2. Berro M, Basquiera A, Rivas MM, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the elderly. Predicting the risk for Non Relapse Mortality. *Medicina (B Aires)*. 2015;75:201-6.
3. Berro M, Palau Nagore MV, Rivas MM, et al. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 functional polymorphisms in myeloablative sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52:739-44.
4. Berro M, Arbelbide J, Rivas MM, et al. Hematopoietic Cell Transplantation-Specific Comorbidity Index predicts morbidity and mortality in autologous stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23:1646-50.

### **Publicaciones en revistas no indexadas**

1. Berro M, Arbelbide JA, Rivas MM, et al. Predicción del Riesgo de Mortalidad en Trasplante Autólogo Hematopoyético. Score del GATMO. *Hematología*. 2017;21:274-80.

### **Presentaciones en congresos con mención a premio**

- Berro M, Arbelbide JA, Rivas MM, et al. Predicción del Riesgo de Mortalidad en Trasplante Autólogo Hematopoyético. Score del Grupo Argentino de Trasplante de Médula Ósea (GATMO). 23° Congreso Argentino de Hematología. Premio al mejor trabajo de investigación clínica (O 007). Mar del Plata, Arg, nov 2017.
- Berro M, Palau Nagore V, Rivas M, et al. Polimorfismos del gen de TGFB1 en trasplante alogénico relacionado. Presentación oral (O 8087) en sesión plenaria 22° Congreso argentino de hematología, Mar del Plata, Arg, nov 2015.
- Berro M, Cooke L, Mayor N, et al. TGFB1 Codon 10 Polymorphisms: Impact on Outcome in Allogeneic Unrelated Donor Haematopoietic Stem Cell Transplantation. Presentacion Poster (P192) Conferencia europea de inmunogenética e histocompatibilidad (EFI), Ulm, Alemania, 2009. Premiado como Best Poster Award.

## Presentaciones en congresos

- Berro M, Arbelbide JA, Rivas MM, et al. Predicting Survival after Autologous stem cell transplantation. The GATMO score. Presentación poster (E1508). 22° Congreso anual de la asociación europea de hematología (EHA), Madrid, España, jun 2017.
- Berro M, Rivas MM, Arbelbide J, et al. HCT-CI in autologous stem cell transplantation. Predicting early and late transplant related mortality. Blood 2016; 128:3449. Presentación poster. 58° Congreso anual de la sociedad americana de hematología (ASH), San Diego E.UU, dic 2016.
- Berro M, Bet L, Trucco J, et al. HCT-CI predicts morbi-mortality in autologous stem cell transplantation. Presentación poster (E1534), 21° Congreso anual de la asociación europea de hematología (EHA), Estocolmo, Suecia, jun 2016.
- Berro M, Palau V, Rivas MM, et al. TGFB1 Funtional Polymorphisms in Sibling Donor HSCT. “TTo be or not TTo be”. Blood. 2015;126:4275. Presentación poster (4275) 57° Congreso anual de la sociedad americana de hematología (ASH), Orlando, EE.UU., dic 2015.
- M Berro, V Palau, M Rivas, et al. TGFB1 Functional Polymorphisms: Impact on Outcome in Allogeneic Sibling Donor Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Blood.2014;124:3806. Presentación poster (3806) 56° Congreso anual de la sociedad americana de hematología (ASH), Orlando, EE.UU., dic 2014.
- Berro M, Garcia J, Basquiera A, et al. Is nota ge but comorbidities. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients Older Than 50 years. Blood. 2013;122:5467. Presentación poster 55° Congreso anual de la sociedad americana de hematología (ASH), New Orleans, EE.UU., dic 2013.
- Berro M, Garcia J, Basquiera AL, et al. No es la edad sino las comorbilidades. Trasplante alogenico de precursores hematopoyéticos en pacientes mayores de 50 años. Presentación oral (OA056) 21° Congreso argentino de hematología, Mar del Plata, Arg, oct 2013.
- Berro M, Rivas MM, Belaustegui S, et al. Reconstitución inmune post trasplante hematopoyético. Un análisis del transforming Growth Factor- $\beta$ 1. Presentación oral (OA139) 20° Congreso argentino de hematología, Mar del Plata, Arg, oct 2011.
- Berro M, Cooke L, Mayor N, et al. TGFB1 Codon 10 Polymorphisms are Associated with Worst Outcome in Allogeneic Unrelated Donor Haematopoietic Stem Cell Transplantation. Presentación Poster (811) 35° Congreso Europeo de Trasplante de medula Osea (EBMT), Gotemburgo, Suecia, marzo 2009.

- Berro M, Cooke L, Mayor N, et al. TGF B1 Functional Polymorphisms: Impact on Outcome in Allogeneic Unrelated Donor Haematopoietic Stem Cell Transplantation. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2008; 112: 3011. Poster presentation (Num.3011), San Francisco, EE.UU., diciembre 2008.

## **Abreviaturas**

AAS: Anemia aplásica severa.  
 ADN: Ácido desoxirribonucleico.  
 AMV; Análisis multivariado.  
 ANT: Anthony Nolan Trust.  
 ARM: Asistencia respiratoria mecánica.  
 ASBMT: Sociedad americana de trasplante hematopoyético, por sus siglas en inglés *American Society for Blood and Marrow Transplantation*  
 ATG: Globulina antilinfocitaria.  
 CD: *Cluster* de diferenciación.  
 CFSE: Carboxyfluorescein succinimidyl ester.  
 CIBMTR: centro internacional de investigación en trasplante hematopoyético, por sus siglas en inglés *Center for International Blood and Marrow Transplant Research*  
 CMSP: Células madre de sangre periférica.  
 CMV: Citomegalovirus.  
 Col: Colaboradores.  
 CPA: Células presentadoras de antígenos.  
 CPH: Células progenitoras hematopoyéticas.  
 Cy: Ciclofosfamida.  
 DLI: infusión de linfocitos del donante, por sus siglas en inglés *Donor Lymphocyte Infusion*)  
 dNTPs: Oligonucleótidos.  
 EBMT: Grupo europeo de trasplante hematopoyético, por sus siglas en inglés *European Blood and Marrow Transplantation*.  
 EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.  
 EE/EP: Enfermedad estable/progresada.  
 EICH: Enfermedad injerto contra huésped.  
 EICHa: EICH aguda.  
 EICHc: EICH crónica..  
 FACS: citometría de flujo, por sus siglas en inglés *Fluorescence-activated cell sorting*.  
 FOXP3: *Forkhead box P3*.  
 GATMO: Grupo Argentino de Trasplante de Médula Osea.  
 HCT-CI: puntaje de comorbilidades específico de trasplante hematopoyético, por sus siglas en inglés *Hematopoietic Cell transplant Comorbidity Index*.  
 HLA: complejo mayor de histocompatibilidad, por sus siglas en inglés *Human Leukocyte Antigen*.  
 HR: cociente de riesgo, por sus siglas en inglés *Hazard ratio*.  
 ICT: Irradiación corporal total.  
 IFN- $\gamma$ : Interferón-gamma.  
 INCUCAI: Instituto Nacional Central Único Coordinador de Ablación e Implante  
 IOT: intubación orotraqueal  
 IPSS-R: Sistema internacional de predicción de pronóstico revisado, por sus siglas en inglés *International prognostic scoring system-revised*..

LAP: proteína asociada de latencia, por sus siglas en inglés *latency associated protein*.  
LH: Linfoma de Hodgkin.  
LLA: Leucemia linfoblástica aguda.  
LLC: Leucemia linfática crónica.  
LMA: Leucemia mieloblástica aguda.  
LMC: Leucemia mieloide crónica.  
LNH: Linfoma no Hodgkin.  
MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de Magnesio.  
MLE: Mortalidad libre de enfermedad.  
MM: Mieloma múltiple.  
NaCl: Cloruro de Sodio.  
NR: No relacionado.  
PB: Pares de bases.  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés *Polimerase chain reaction*.  
PRICAI: Primer Centro Argentino de Inmunogenética.  
RC: Remisión completa.  
RP: Remisión parcial.  
RPM: Revoluciones por minuto.  
RPMI: Medio Roswell Park Memorial.  
SG: Sobrevida Global.  
SLE: Sobrevida libre de enfermedad.  
SMD: Síndromes mielodisplásicos.  
SNP: polimorfismos de secuencia única, por siglas en inglés *single nucleotide polymorphism*.  
SOS: Síndrome de oclusión sinusoidal.  
SSP-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa alelo específica, por sus siglas en inglés *Sequence specific primer-PCR*.  
TA: Temperatura ambiente.  
TCPH: Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.  
TGF-β1: Factor de crecimiento transformante-beta1, por sus siglas en inglés *Transforming growth factor-β1* (cuando se hace referencia al gen: *TGFβ1*).  
Th1: Linfocitos T CD4+ tipo I.  
Th2: Linfocitos T CD4+ tipo II.  
Th17: Linfocitos T CD4+/CD17+.  
Th9: Linfocitos T CD4 productor de IL9.  
Tm: Temperatura de media de fusión.  
TNF-α: Factor de necrosis tumoral-alfa, por sus siglas en inglés *Tumour Necrosis factor-α*.  
Treg; Linfocitos T reguladores.  
UCU: Unidad de cordón umbilical.

## ÍNDICE

<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	1
<b><u>1. Trasplante de células progenitoras hematopoyético</u></b> .....	2
<b>1.1. Historia del TCPH</b> .....	2
<b>1.2. Generalidades del TCPH</b> .....	5
<b>1.3. Indicaciones de TCPH</b> .....	6
1.3.1. Indicaciones de TCPH Autólogo.....	6
1.3.2. Indicaciones de TCPH Alogénico con donante histoiéntico relacionado. ....	7
1.3.3. Indicaciones de TCPH Alogénico con donante histoiéntico NR...8	
1.3.4. Indicaciones de TCPH Alogénico con donante alternativo.....8	
<b>1.4. Incidencia según el tipo de trasplante</b> .....	9
<b>1.5. Fuente</b> .....	10
<b>1.6. Acondicionamiento y regímenes de inmunosupresión</b> .....	12
<b>1.7. Complicaciones del trasplante</b> .....	13
1.7.1. Mortalidad Libre de enfermedad.....	14
1.7.1.1. Toxicidad del régimen.....	14
1.7.1.2. Infecciones.....	14
1.7.1.3. Síndrome de oclusión sinusoidal.....	15
1.7.1.4. Rechazo del Injerto.....	15
1.7.1.5. Enfermedad Injerto vs. Huésped.....	16
• <i>EICH aguda</i> .....	17
• <i>EICH crónica</i> .....	22
1.7.2. Recaída.....	23
<b>1.8. Factores de Riesgo asociados a complicaciones post trasplante</b> .....	23
1.8.1. Compatibilidad genética.....	23
1.8.2. El estado del paciente previo al trasplante.....	23
1.8.3. Enfermedad de base y <i>status</i> pre-trasplante.....	25
1.8.4. Características del donante.....	26
1.8.5. Acondicionamiento utilizado (ver 1.6).....	26
<b><u>2. Factor de crecimiento transformante-β1</u></b> .....	26
<b>2.1. Generalidades</b> .....	26
<b>2.2. Proceso de secreción</b> .....	28
<b>2.3. Variantes polimórficas del gen <i>TGFBI</i></b> .....	29
<b>2.4. Rol de TGF-β1 en el TCPH</b> .....	31
<b><u>OBJETIVOS y HIPÓTESIS</u></b> .....	34

<b><u>MÉTODOS</u></b> .....	37
<b><u>CAPITULO 1. EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE LAS VARIABLES CLÍNICAS EN LA MORBIMORTALIDAD DEL TCPH.</u></b> .....	38
<b><u>1. Poblaciones</u></b> .....	38
<b>1.1. Trasplante autólogo de CPH.</b> .....	38
1.1.1. Impacto de las variables clínicas en el trasplante autólogo.....	38
1.1.2. Desarrollo del sistema multifactorial de predicción de MLE.....	39
<b>1.2. Trasplante alogénico de CPH.</b> .....	39
1.2.1. Impacto de las variables clínicas en el trasplante alogénico.....	39
1.2.2. Trasplantes alogénicos en pacientes mayores.....	40
<b><u>2. Análisis estadístico</u></b> .....	40
<b>2.1. Análisis univariados</b> .....	40
<b>2.2. Análisis multivariados</b> .....	41
<b><u>CAPITULO 2. EVALUACIÓN DEL ROL DE TGF-β1 EN EL TCPH ALOGENICO</u></b> .....	42
<b><u>1. Impacto de los polimorfismo funcionales del gen <i>TGFBI</i></u></b> .....	42
<b>1.1. Poblaciones</b> .....	42
1.1.1. Trasplante alogénico relacionado. ....	42
1.1.2. Trasplante alogénico NR. ....	42
<b>1.2. Extracción de ADN</b> .....	43
1.2.1. Técnica “ <i>salting out</i> ” .....	43
1.2.2. Muestras provenientes de cepillado de mucosa oral.....	44
1.2.3. Análisis cualitativo y cualitativo. Determinación de concentración y pureza.....	44
<b>1.3. Reacción de PCR alelo específica</b> .....	45
1.3.1. Elección de los <i>primers</i> .....	45
1.3.2. Diseño de la reacción de PCR alelo específica.....	45
1.3.3. Reacción final de PCR .....	46
1.3.4. Lectura del producto final.....	47
1.3.5. Confirmación de los resultados mediante secuenciación.....	48
<b>1.4. Análisis estadístico</b> .....	50
<b><u>2. Análisis funcionales de TGF-B1 en el TCPH</u></b> .....	51
<b>2.1. Obtención de células mononucleadas de sangre periférica</b> .....	51
2.1.1. Técnica de <i>lymphoprep</i> .....	51
2.1.2. Gradiente de Fycoll.....	51

2.2. Aislamiento de células T CD4+ y T reguladore.....	51
2.3. Análisis de activación <i>in vitro</i> de células T reguladores.....	52
2.4. Análisis por citometría de flujo.....	52
2.5. Patrón de activación <i>in vivo</i> de los linfocitos T reguladores.....	53
2.6. Impacto de los polimorfismos de <i>TGFB1</i> en la capacidad supresora <i>in vitro</i> de los linfocitos T reguladores.....	54
2.7. Medición de TGF-β1 por técnica de luminex.....	54
2.8. Análisis estadístico.....	55
<b>RESULTADOS</b> .....	56
<b>CAPÍTULO 1. EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE LAS VARIABLES CLÍNICAS EN LA MORBI-MORTALIDAD DEL TRASPLANTE DE CPH</b> .....	57
<b>1. Impacto de las variables clínicas en el trasplante autólogo de CPH</b> .....	58
1.1. Evaluación del HCT-CI en los eventos tempranos posteriores al trasplante.....	59
1.2. Evaluación del HCT-CI en los eventos a largo plazo luego del trasplante.....	59
1.3. Análisis multivariados .....	60
1.4. Análisis de variables clínicas independientes de las comorbilidades.....	62
1.5. Análisis del impacto del HCT-CI en subgrupos según patologías.....	63
1,5,1, Mieloma múltiple.....	63
1.5.2. Linfomas.....	63
1.6. Sistema multifactorial de predicción de MLE.....	64
1.6.1. Construcción del modelo de predicción.....	64
1.6.2. Evaluación del modelo construido .....	68
<b>2. Impacto de las variables clínicas en el trasplante alogénico</b> .....	70
2.1. Falla primaria del injerto.....	71
2.2. Enfermedad injerto vs. huésped aguda.....	71
2.3. Enfermedad injerto vs. huésped crónica.....	72
2.4. Mortalidad libre de enfermedad y recaída.....	73
2.5. Sobrevida libre de enfermedad y sobrevida global.....	75
2.6. Variables clínicas en el trasplante alogénico en pacientes mayores.....	78
2.6.1. Enfermedad injerto vs. huésped aguda.....	79
2.6.2. Enfermedad injerto vs. huésped crónica.....	80
2.6.3. Mortalidad libre de enfermedad y recaída.....	80
2.6.4. Sobrevida libre de enfermedad y sobrevida global.....	81
<b>DISCUSIÓN</b> .....	84



<b><u>1. Variables clínicas en el trasplante autólogo</u></b> .....	85
<b><u>2. Variables clínicas en el trasplante alogénico</u></b> .....	90
<b>CAPITULO 2. EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE LOS POLIMORFISMOS FUNCIONALES DEL GEN <i>TGFBI</i> EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO</b> .....	97
<b><u>1. Polimorfismos del gen de <i>TGFBI</i> y trasplante alogénico relacionado</u></b> .....	98
<b>1.1. Análisis de los polimorfismos</b> .....	99
<b>1.2. Cohorte completa</b> .....	100
1.2.1. Enfermedad injerto vs. huésped .....	100
1.2.2. Análisis de sobrevida.....	101
<b>1.3. Sub-análisis trasplantes mieloablativos</b> .....	101
1.3.1. Descripción de la población .....	101
1.3.2. Enfermedad injerto vs. huésped .....	101
1.3.3. Análisis de sobrevida.....	103
<b><u>2. Polimorfismos del gen de <i>TGFBI</i> y trasplante alogénico NR</u></b> .....	105
<b>2.1. Análisis de los polimorfismos</b> .....	106
<b>2.2. Cohorte completa</b> .....	108
2.2.1. Enfermedad injerto vs. huésped.....	108
2.2.2. Análisis de sobrevida.....	108
<b>2.3. Sub-análisis trasplantes mieloablativos</b> .....	109
2.3.1. Descripción de la población .....	109
2.3.2. Enfermedad injerto vs. huésped.....	109
2.3.3 Análisis de sobrevida.....	110
<b><u>3. Análisis funcionales de TGF-β1 en el trasplante hematopoyético</u></b> .....	113
<b>3.1. Evaluación de TGF-β1 en el trasplante hematopoyético</b> .....	113
3.1.1. Patrón de activación <i>in vitro</i> de los Tregs.....	113
3.1.2. Patrón de activación <i>in vivo</i> de los Tregs.....	114
3.1.3. Análisis de la sobrevida en función de los niveles plasmáticos de TGF-β1. ....	117
<b>3.2. Impacto de los polimorfismos del gen de <i>TGFBI</i> sobre la funcionalidad de la citoquina</b> .....	118
3.2.1. Patrón de supresión de los Tregs.....	118
3.2.2. Análisis de los niveles plasmáticos de TGF-β1 en función de los SNP +29C>T y +74G>C. ....	119
<b><u>DISCUSIÓN</u></b> .....	122
<b><u>1. Polimorfismos del gen <i>TGFBI</i> y trasplante alogénico relacionado</u></b> .....	124

<b><u>2. Polimorfismos del gen <i>TGFBI</i> y trasplante alogénico no relacionado</u></b> .....	129
<b><u>3. Estudios funcionales</u></b> .....	133
<b><u>DISCUSIÓN GENERAL</u></b> .....	136
<b><u>CONCLUSIONES</u></b> .....	142
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	146

# **INTRODUCCIÓN**

## **1. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas**

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) consiste en el reemplazo del sistema hematopoyético por uno nuevo. Es una herramienta potencialmente curativa para numerosas patologías, fundamentalmente oncohematológicas (Sureda, Biol Blood Marrow Transplant 2015; Majhail, Biol Blood Marrow Transplant 2015; Granfeldt Ostgard, Biol Blood Marrow Transplant 2018).

Existen distintos tipos de TCPH: el autólogo, donde las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) provienen del mismo paciente, y el alogénico, donde las CPH provienen de otro individuo. El trasplante alogénico se clasifica de acuerdo al grado de compatibilidad y al parentesco entre el donante y el receptor (Copelan, NEJM 2006), según:

- La disparidad de los genes histocompatibilidad (HLA, por sus siglas en inglés *human leukocyte antigen*) en: singénico (el donante es un hermano gemelo), histoidéntico (comparte la totalidad de los genes HLA), parcialmente histoidéntico (existe una incompatibilidad en 1 o 2 genes de HLA) o haploidéntico (comparten un haplotipo de HLA).
- El parentesco en: relacionado, cuando el donante es familiar del paciente (hermano, hijo, padre), o no relacionado (NR), cuando el donante proviene de registros internacionales.

### **1.1. Historia del TCPH**

El final de la Segunda Guerra Mundial fue marcado por los estallidos de las bombas atómicas sobre Hiroshima y Nagasaki. Ese punto de inflexión en la historia de la humanidad marcó también el inicio de la preocupación por evitar los efectos mortales que pudieran ocurrir a los individuos que sobrevivieran al primer momento de deflagración. Si bien se reconocieron varios síndromes que ocurren luego de la explosión nuclear, el síndrome de fallo de la médula ósea y los subsiguientes síndromes oncohematológicos observados *a posteriori* fueron considerados de máxima severidad y motorizaron una gran inversión en investigaciones para paliar los mismos.

Por otro lado, hasta la década del 60 la mortalidad por patologías oncohematológicas, en especial relacionadas con leucemias agudas, síndromes de insuficiencia medular e inmunodeficiencias, era extremadamente alta, o significaban simplemente enfermedades sin esperanza de curación (Sorensen, Cancer 1993; Beutler, Leukemia 2001). Con el transcurso del tiempo se profundizó notablemente el

entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos de estas enfermedades. En las últimas décadas, la mortalidad ha bajado considerablemente gracias a los avances en los conocimientos de la biología molecular, el empleo de mejores herramientas terapéuticas y el desarrollo de mecanismos de sostén más sofisticados (SEER, Stat Fact Sheets: Leukemia 2017; Levi, Leukemia 2000).

El TCPH ha constituido, sin dudas, una de las herramientas más notables en el tratamiento de estas patologías. Los primeros experimentos fueron hechos en modelos animales a principio de la década del 50. Congdon y colaboradores (col.), a la par de Lorenz y col., fueron los primeros en publicar experiencias en modelos murinos que lograron sobrevivir a dosis letales de irradiación gracias a la inyección de médula ósea de animales genéticamente idénticos (homólogos) (Lorenz, Radiation 1952; Urso, Blood 1957; Congdon, Blood 1957).

Hacia finales de la década, un grupo de investigadores de la Universidad de Columbia publicó resultados similares en modelos caninos. Demostraron una supervivencia prolongada en los canes que recibieron una infusión de CPH homólogas precedida de dosis letales de irradiación corporal. Mientras que, el 100% del grupo control, aquellos que no habían recibido CPH, fallecieron antes del día 15 (Thomas, Blood 1959). Además, observaron que la recuperación hematopoyética comenzaba a partir del día 20 post infusión. Este mismo grupo demostró una recuperación hematopoyética similar luego de una infusión de CPH autólogas en modelos caninos (Mannick, Blood 1960).

El grupo de Donald E Thomas fue uno de los primeros en publicar los resultados de trasplante hematopoyético en humanos (Thomas, NEJM 1957; Thomas, Blood 1959). La experiencia inicial incluyó a 6 pacientes, ampliándose posteriormente con otros 6 pacientes adicionales, quienes recibieron un trasplante luego de un acondicionamiento mieloablativo basado en quimio-radioterapia. Todos los pacientes fallecieron en los primeros 6 meses, pero los dos individuos que habían recibido CPH de gemelos idénticos lograron reconstitución hematopoyética para luego fallecer por recaída de la leucemia (Thomas, Blood 1959).

Esta observación permitió establecer que la clave se encontraba en la selección del donante. La descripción de los HLA por Dausset (Dausset, Acta Haematol 1958), hecho que le valió el premio Nobel de Medicina en 1980 junto a Snell y Benacerraf, marcó un hito de importancia y permitió, a su vez, mejorar los resultados con los trasplantes hematopoyéticos.

En 1969 se inició el programa prospectivo de trasplante alogénico relacionado en leucemias agudas avanzadas evidenciando un *platau* en las curvas de supervivencia que sugería la curación de un pequeño porcentaje de pacientes (Thomas, NEJM 1975 I y II). A su vez, este hecho sentó el precedente para ampliar la experiencia en leucemias en etapas más tempranas donde se observó una tasa de curación cercana al 50% (Thomas, NEJM 1979). En 1990 Thomas fue galardonado con el primer Nobel de Medicina por sus aportes en el trasplante hematoyético.

En nuestro país los primeros trasplantes alogénicos fueron realizados en el año 1986 en paralelo por los equipos del Dr. Bullorsky y Robinson en los hospitales Británico de Buenos Aires y Naval “Cirujano Dr. Pedro Mallo”, respectivamente.

El primer TCPH utilizando donantes NR fue realizado en 1972 por O’Reilly (O’Reilly, NEJM 1977) a un paciente con inmunodeficiencia combinada severa. Luego de este primer trasplante se avanzó con resultados exitosos sobre otras patologías incluyendo el de un paciente pediátrico con enfermedad granulomatosa crónica (Foroozfar, Lancet 1977) y el de otro con leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Hansen, NEJM 1980). El primer registro de donantes NR de CPH fue creado por Shirley Nolan en 1974 al no contar con un donante relacionado histoidéntico para su hijo Anthony Nolan, portador del síndrome de Wiskott Aldrich. A partir de entonces se han creado numerosos registros internacionales, llegando en la actualidad a más de 33.000.000 de donantes registrados (<https://statistics.wmda.info/>, 21/11/2018). En nuestro país este tipo de trasplante fue realizado por primera vez por el equipo del Dr. Jaimovich. en 1995 en el Sanatorio Antártida.

El trasplante autólogo es un procedimiento más simple. Pacientes portadores de patologías quimiosensibles, sobre todo en aquellos modelos que muestran una curva dosis respuesta empinada, son sometidos a altas dosis de quimio-radioterapia con posterior rescate con CPH autólogas. A fin de evitar la aplasia sostenida provocada por las dosis supraletales sobre la médula ósea, el paciente recibe sus propias CPH para lograr la recuperación hematopoyética. Los primeros datos de la administración de altas dosis de quimio-radioterapia seguidos de rescate con CPH autólogos en patologías oncohematológicas fueron publicados en 1959 (McFarland, Blood 1959). En 1962, Kurnick y col. presentaron la primer serie con un número importante de pacientes (82 trasplantes) con diferentes patologías malignas (Kurnick, Transfusion 1962). Cavins y col. fueron quienes describieron por primera vez la técnica de criopreservación de CPH utilizando dimetilsulfóxido en caninos (Cavins, Criobiology 1965). En 1978 se

comunicó el primer estudio prospectivo donde se comparó la recuperación hematopoyética luego de altas dosis de quimioterapia a 22 pacientes, 12 de los cuales fueron rescatados con CPH autólogas criopreservadas (recuperación hematopoyética a los 13 días) vs. 10 casos control (recuperación a los 23 días) (Appelbaum, Blood 1978).

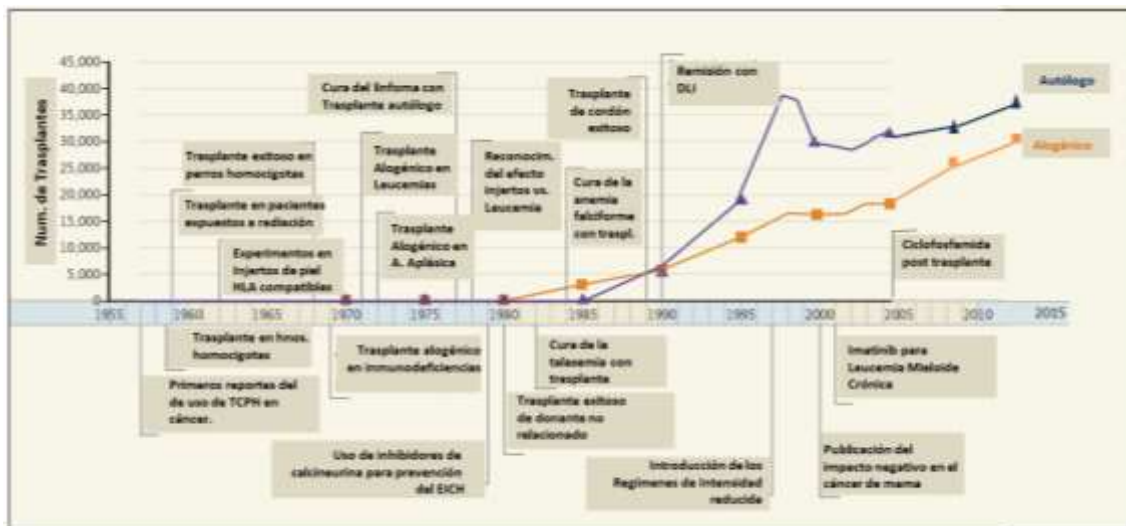


Figura 1. Línea de tiempo que grafica los hechos históricos más relevantes en la historia del trasplante hematopoyético. (Adaptado según Appelbaum, NEJM 2007; actualizado con datos de Niederwieser, Bone Marrow Transplant 2016). DLI, infusión de linfocitos del donante; EICH, enfermedad injerto contra huésped; A, anemia. Num, número; HLA *human leukocyte antigen*; transpl, trasplante.

## 1.2. Generalidades del TCPH

El potencial curativo del trasplante autólogo deriva de las dosis mieloablativas de quimio-radioterapia administradas al paciente previo al rescate con las CPH autólogas, llamado acondicionamiento. En el caso del trasplante alogénico al efecto antitumoral del acondicionamiento se le agrega el efecto antitumoral potencial proveniente del sistema inmunológico del injerto, llamado injerto-vs.-tumor.

En el trasplante alogénico existen dos circunstancias importantes que deben tenerse en cuenta para que el procedimiento tenga éxito. La primera involucra la disponibilidad de un donante compatible. De acuerdo a las leyes de la herencia de los antígenos de histocompatibilidad, que siguen un patrón mendeliano simple, un paciente tiene un 25% de posibilidades de contar con un donante familiar genótipicamente histoidéntico. En segundo lugar, y casi como una característica distintiva del trasplante hematopoyético alogénico, se deben tener en cuenta las complicaciones inmunológicas: la enfermedad injerto contra huésped (EICH), el rechazo del injerto y la reconstitución inmune (ver Introducción 1.7).

Los resultados obtenidos luego del trasplante han mejorado significativamente en las últimas décadas (Gooley, NEJM 2010). Esto se debe, en parte, al mejor

entendimiento de lo que significa la compatibilidad HLA con el advenimiento de las técnicas de alta resolución para su tipificación, lo que ayuda a una mejor selección de los donantes (Petersdorf, *Tissue Antigens* 2003; Pidala, *Blood* 2014). Este avance llevó al establecimiento de registros internacionales de donantes NR facilitando el hallazgo de un donante compatible. En segundo, lugar a un incremento en la seguridad de los acondicionamientos pre-trasplante (Aschan, *Best Pract Res Clin Haematol* 2007) y a una mejora en las terapias inmunosupresoras y en las medidas de soporte.

Varios factores genéticos, tanto en pacientes como en donantes, juegan un rol en el resultado del trasplante. Aparte de los ya definidos genes de HLA clase I (HLA-A, -B, -C) y clase II (HLA-DR, -DQ, -DP) (Shaw, *Blood* 2007), otros genes no-HLA han sido asociados con cambios en los resultados del trasplante (Cavet, *Blood* 2001; Rocha, *Blood* 2002; Mayor, *J Clin Oncol* 2007; Chien, *Blood* 2012; Dickinson, *Immunogenetics* 2015).

### **1.3. Indicaciones de TCPH**

#### **1.3.1. Indicaciones de TCPH Autólogo**

Según las últimas guías del grupo Europeo de Trasplante Hematopoyético (EBMT en inglés *European Blood and Marrow Transplantation*) (Sureda, *Bone Marrow Transplant* 2015) y del Grupo Americano de Trasplante Hematopoyético (ASBMT por sus siglas en inglés, *American Society for Blood and Marrow Transplantation*) (Majhail, *Biol Blood Marrow Transplant* 2015), publicadas el año 2015, el trasplante autólogo está indicado en las siguientes situaciones clínicas:

- Mieloma múltiple (MM) en 1° remisión (estándar de tratamiento).
- Linfoma no Hodgkin (LNH) de células del manto en 1° remisión (estándar de tratamiento).
- LNH B de células grandes en 2° remisión (estándar de tratamiento). En 1° remisión para los casos de alto riesgo (opción clínica).
- Linfoma de Hodgkin (LH) en 2° remisión (estándar de tratamiento).
- LNH B folicular en 2° remisión (estándar de tratamiento).
- LNH T en 1° remisión (opción clínica).
- Macroglobulinemia de Waldstrom en 2° remisión (opción clínica).
- Amiloidosis (opción clínica).



- Tumor de Ewing quimiosensible local avanzado o metastásico (opción clínica).
- Tumores de células germinales en 2° remisión (estándar de tratamiento).
- Patologías autoinmunes como: esclerosis múltiple, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoidea (opción clínica).
- Neuroblastoma de alto riesgo en 1° remisión o de bajo riesgo en 2° remisión (estándar de tratamiento).
- Sarcomas de partes blandas de alto riesgo en 1° remisión o de bajo riesgo en 2° remisión (opción clínica) (en pacientes pediátricos).

### 1.3.2. Indicaciones de TCPH Alogénico con donante histoiéntico relacionado

Basados en las guías descriptas en la sección anterior, las indicaciones de trasplante alogénico con donante histoiéntico relacionado son:

- Leucemia mieloblástica aguda (LMA) de riesgo intermedio y alto (de acuerdo al perfil citogenético/molecular) en 1° remisión completa (RC), cualquier riesgo 2° RC o LMA secundaria en 1° RC (estándar de tratamiento).
- LLA Filadelfia positiva en 1° RC, de alto riesgo en 1° RC y de cualquier riesgo en 2° RC (estándar de tratamiento).
- Síndromes mielodisplásicos (SMD) de riesgo intermedio II o alto según el sistema internacional de predicción de pronóstico revisado (IPSS-R) (estándar de tratamiento).
- Anemia aplásica severa (AAS) como primera línea de tratamiento (estándar de tratamiento).
- Leucemia mieloide crónica (LMC) fase crónica refractaria a inhibidores de tirosina quinasa, fase acelerada, crisis blástica o 2° fase crónica (estándar de tratamiento).
- Mielofibrosis primaria o secundaria de riesgo intermedio o alto según el sistema de puntuación dinámico internacional (DIPSS) (estándar de tratamiento).
- Leucemia linfática crónica (LLC) con cariotipo de alto riesgo (estándar de tratamiento).

- LNH B de grandes células en recaído quimiosensible luego de trasplante autólogo (estándar de tratamiento).
- LNH del manto recaído quimiosensible luego de trasplante autólogo (estándar de tratamiento).
- LNH B folicular recaído quimiosensible luego de trasplante autólogo (estándar de tratamiento).
- LH recaído quimiosensible luego de trasplante autólogo (estándar de tratamiento).
- LNH T recaído quimiosensible luego de trasplante autólogo (estándar de tratamiento).
- Fallos medulares congénitos (ej. anemia de Fanconi) (estándar de tratamiento).
- Hemoglobinopatías (ej. talasemias mayores o anemia falciforme) (estándar de tratamiento).
- Enfermedades de depósitos de la infancia (estándar de tratamiento).
- Inmunodeficiencias (ej. inmunodeficiencia primaria combinada severa, enfermedad granulomatosa crónica) (estándar de tratamiento).
- MM en 2° remisión (opción clínica).

### 1.3.3. Indicaciones de TCPH Alogénico con donante histoiéntico NR

Las indicaciones de trasplante alogénico con donante histoiéntico no relacionado son similares a las de donante relacionado histoiéntico, excluyendo las siguientes indicaciones: LMA de riesgo intermedio en 1° RC; AAS como primera línea de tratamiento para pacientes adultos. Además, en las hemoglobinopatías se lo considera una opción clínica y no un estándar de tratamiento.

### 1.3.4. Indicaciones de TCPH Alogénico con donante alternativo

Las indicaciones de trasplante alogénico con donante alternativo (incluye NR con algún grado de incompatibilidad HLA, donantes haplooiénticos y cordón umbilical como fuente de CPH) son similares a las de donante NR histoiéntico pero, dado su menor desarrollo, se consideran una opción clínica en algunas patologías.

#### **1.4. Incidencias según el tipo de trasplante**

El incremento en las indicaciones de trasplante ha sido exponencial durante las últimas 3 décadas (Appelbaum, NEJM 2007; Niederwieser. Bone Marrow Transplant 2016). Según la última actualización de la Red Mundial de Trasplante Hematopoyético (WNBMTG por sus siglas en inglés *World Network for Blood and Marrow Transplantation Group*) en el año 2006 se habían realizado 46000 trasplantes, mientras que 2012 se realizaron 68146 trasplantes (Niederwieser, Bone Marrow Transplant 2016). De ellos, el 53% fueron autólogos y los restantes alogénicos. En el año 2000 se realizaron alrededor de 3100 trasplantes autólogos según el informe del Centro Internacional de Investigación en Trasplante Hematopoyético (CIBMTR por sus siglas en inglés *Center for International Blood and Marrow Transplant Research*) y menos de 30% de ellos fueron en pacientes mayores de 60 años. En el año 2015 se llevaron a cabo cerca de 9000 y más del 50% fueron pacientes mayores de 60 años incluyendo 12% mayores de 70 años (D'Souza, CIBMTR 2016).

Más allá de este crecimiento en todo sentido del trasplante hematopoyético, se destacan dos hechos en particular: el crecimiento del uso de donante NR y el de donante haploidéntico. En el año 1988, en los Estados Unidos (EE.UU..) se realizaron 54 trasplantes con donante provisto por el programa nacional de donante NR, en 1997, 879 y, en 2007, 2640 (Balle, Biol Blood Marrow Transplant 2008). En relación al total de trasplantes realizados en EE.UU., según el CIBMTR, en el año 2000 se realizaron aproximadamente 2200 trasplantes con donante histoidéntico relacionado, 1500 con donante NR y 400 con donante haploidéntico; mientras que, en el año 2015, 2500 fueron realizados con donantes histoidéntico relacionado, 5200 con donante NR y 1100 con donantes haploidénticos (D'Souza, CIBMTR 2016).

De los 8890 trasplantes alogénicos realizados en Europa en el 2005, se realizaron 4759 con donante histoidéntico relacionado y 3617 con donante NR (Gratwohl, Bone Marrow Transplant 2007); mientras que, en el 2015 se incrementaron a 6212 histoidénticos relacionados y 9001 NR (Passweg, Bone Marrow Transplant 2017). En el caso de los trasplantes haploidénticos, en el año 2005 se realizaron 500 y en el año 2015, 2000.

El crecimiento del número de trasplantes con donante diferentes al histoidéntico relacionado se debe fundamentalmente a dos hechos. El primero fue el crecimiento de los registros de donantes voluntarios anteriormente mencionado. Clásicamente se consideraba que sólo se podía donar precursores hematopoyéticos si existía

compatibilidad HLA, permitiéndose a lo sumo 1-2 incompatibilidades con el consecuente aumento de los riesgos (Kekre, A J Hematol 2016).

El segundo responde a un cambio de paradigma en el trasplante de CPH. Diferentes plataformas para reducir el riesgo de rechazo y, sobre todo, el de EICH han hecho posible que hoy se practique el trasplante con donante haploidéntico. Estas estrategias se dividen en las que manipulan el injerto *in vitro* y las que lo hacen *in vivo* (ver introducción, 1.6). Entre las últimas, la administración de ciclofosfamida (Cy) post trasplante ha cobrado más uso gracias a la facilidad de su administración, su bajo costo y sus excelentes resultados. Esto ha significado un punto de inflexión en el campo, prácticamente universalizando la disponibilidad de donante.

En relación a la actividad en Argentina, según la comunicación anual del Instituto Nacional Central Único Coordinador de Ablación e Implante (INCUCAI), se ha observado un crecimiento continuo. En 2009 se realizaron 603 trasplantes (438 autólogos, 146 alogénicos relacionados histoidénticos y 19 NR). En el 2014, año que comenzaron los trasplantes haploidénticos, se llevó a cabo un total de 833 trasplantes (527 autólogos, 161 alogénicos relacionados histoidénticos, 112 NR y 33 haploidénticos). En el 2017, el total ascendió a 1066 trasplantes (674 autólogos, 156 relacionados histoidénticos, 115 NR y 121 haploidénticos) (datos aportados por la dirección científico técnica del INCUCAI, informe anual 2018) (figura 2).

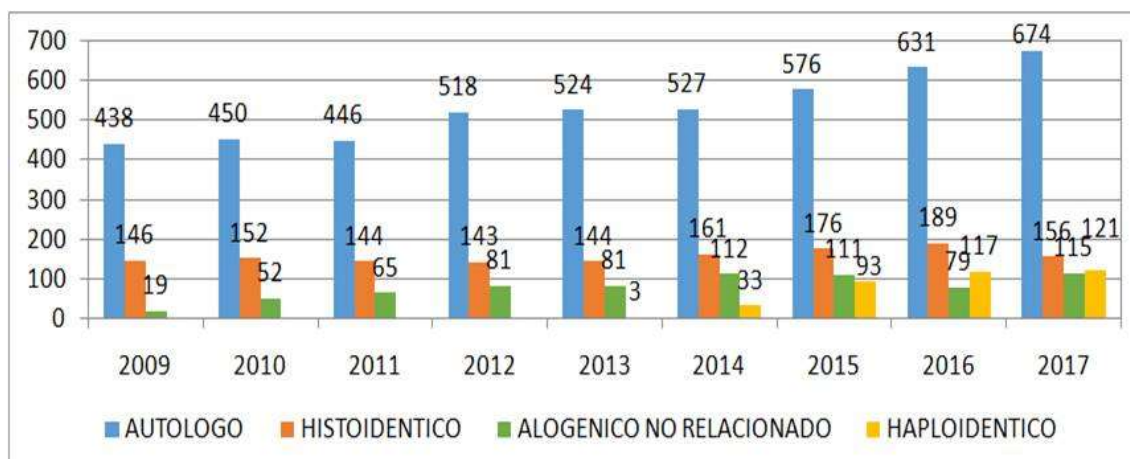


Figura 2. Actividad de trasplante hematopoyético en Argentina desde el año 2009 hasta el año 2017. En azul los trasplante autólogos, naranja alogénicos relacionados, verde no relacionados y amarillo haploidénticos. Gentileza del INCUCAI.

### 1.5. Fuente

Inicialmente se utilizaba la médula ósea como única fuente de CPH. El uso de células madre hematopoyéticas de sangre periférica (CMSP) definidas como aquellas que expresan el *cluster* de diferenciación (CD) 34, fue descrito por primera vez para

trasplante alogénico en 1993 por el grupo de trasplante de Nottingham (Russell, Lancet 1993). En el año 2003, su uso ya superaba el 50%, en 2004 correspondió al 65% de los trasplantes alogénicos en Europa (Gratwhol, Bone Marrow Transplant 2005) y en 2015, al 74% (Passweg, Bone Marrow Transplant 2017). Si bien no está definida cuál es la celularidad óptima de CD34/kg de peso del receptor que deba infundirse, existe un efecto dependiente de dosis (Weaver, Blood 1995). La celularidad mínima requerida para trasplante autólogo sería  $2 \times 10^6$ /kg y la ideal de  $\geq 5 \times 10^6$ /kg (Sauter, Leuk Lymph 2015). Para el caso de los alogénico utilizando CMSP deberían estar entre  $2.5 \times 10^6$  y  $11 \times 10^6$ /kg de peso (Remberger, Biol Blood Marrow Transplant 2015).

En el año 1988 se introdujo la donación de CPH provenientes de sangre de cordón (Gluckman, 1989 N Engl J Med), realizándose 86 trasplantes. En el año 2005 se realizaron 395, representando el 4% del total de los procedimientos en Europa. En la actualidad esta fuente parece haber alcanzado un *platau* al ser utilizada en el 3,7% de los trasplantes (Passweg, Bone Marrow Transplant 2017), parcialmente explicado por el incremento del trasplante haploidéntico.

Existen diferencias claramente demostradas entre las distintas fuentes. Considerándose la fuente de sangre periférica como la de mayor uso, la fuente de médula ósea tiene un mayor tiempo al prendimiento de neutrófilos segmentados (definido como el día en el que se alcanza un recuento mayor a  $500/\mu\text{L}$ ) y de plaquetas (el día en el que se alcanzan  $30000/\mu\text{L}$  libre de transfusión en las 48hs previas). Además, está asociado a una menor tasa de EICH (ver introducción 1.7.2), sobre todo en su forma crónica, con resultados similares en términos de sobrevida global (Davies, Blood 2000; Bensinger, Curr Opin Oncol 2012). Por esta razón, sumado a la mayor incidencia de patologías benignas en las que no se busca un fenómeno de injerto-vs.-tumor, sigue siendo la fuente de mayor uso en pediatría (Passweg, Bone Marrow Transplant 2016).

En el caso de la unidad de cordón umbilical, esta fuente se asocia con un aumento aún más marcado en los tiempos al prendimiento de neutrófilos segmentados y de plaquetas, menor tasa de EICH pero con peores índices de sobrevida global (Cheng, Chin Med Journal 2013). A su vez, su uso tiene una limitación en la celularidad obtenida durante la colecta. Como el número de células obtenidas debe guardar una relación con el peso del receptor (al menos  $10^7$  células nucleadas totales por kg de peso del receptor), el cordón umbilical es una fuente casi exclusiva de la población pediátrica (Passweg, Bone Marrow Transplant 2016).

## 1.6. Acondicionamiento y regímenes de inmunosupresión

Como se describió previamente, el trasplante autólogo es precedido por altas dosis de quimio/radioterapia definidas como mieloablativas, ya que el acondicionamiento es la única herramienta anti-tumoral en este escenario.

En el caso del trasplante alogénico, el acondicionamiento ha cambiado significativamente con el paso del tiempo. Desde 1971, cuando se introdujo por primera vez para un trasplante singénico hasta la década pasada, el esquema estándar mieloablativo consistía en la combinación de irradiación corporal total (ICT) con Ciclofosfamida (ICT-Cy) (Copelan, NEJM 2006). Posteriormente, esquemas quimioterapéuticos a base de Busulfán (combinado con otros agentes alquilantes como la ciclofosfamida, la fludarabina o el melfalán) han demostrado tener resultados similares o superiores a ICT-Cy para todas las patologías con excepción de la LLA. El riesgo de recaída en el sistema nervioso central en la LLA es considerable, y la ICT, a diferencia de muchos agentes quimioterapéuticos, no tiene la limitación de la barrera hemato-encefálica (Aschan, Best Pract Res Clin Haematol 2007).

Debido a la alta morbi-mortalidad asociada a los acondicionamientos mieloablativos, se introdujo la opción de acondicionamientos de intensidad reducida (RIC por sus siglas en inglés *reduced intensity conditioning*) utilizando, generalmente, fludarabina. En este escenario, el objetivo se focaliza en un esquema fundamentalmente inmunosupresor para evitar el rechazo del injerto; mientras que, el injerto toma la función de agente antitumoral en base a su conocido efecto injerto-vs.-tumor (Bacigalupo, Biol Blood Marrow Transplant 2009; Deeg, Blood 2010; Gyurkocza, Blood 2014). Con los RIC se logró disminuir las tasas de mortalidad relacionada al trasplante, también llamada mortalidad libre de enfermedad (MLE) (ver introducción 1.7), facilitando el trasplante a pacientes mayores (Baron, J Clin Oncol 2005; Alyea, Blood 2005; Aoudjhane, Leukemia 2005; Aschan, Best Pract Res Clin Haematol 2007; Baron, Curr Opin Hematol 2007; Estey, Blood 2007; Koreth, Biol Blood Marrow Transplant 2010; Koreth, J Clin Oncol 2013).

Los esquemas inmunosupresores son, clásicamente, a base de un inhibidor de la calcineurina. Esta enzima es una fosfatasa dependiente de calcio que se encuentra cascada abajo en la activación de las células T luego del contacto del receptor (TCR) con el antígeno. Inicialmente se utilizaba ciclosporina y, en la actualidad, el más comúnmente utilizado es el tacrolimus (Horowitz, Biol Blood Marrow Transplant 1999; Hiraoka, Bone Marrow Transplant 2001; Yanada, Bone Marrow Transplant 2004;

Inamoto, Biol Blood Marrow Transplant 2011). El inhibidor de calcineurina se suele combinar con bajas dosis de metotrexato.

A fin de prevenir la EICH, cuando se utilizan donantes NR, se han intentado diferentes medidas de depleción de células T, las cuales se dividen en depleción *in vitro* o *in vivo*. Estas últimas técnicas son las más utilizadas, predominando el uso de alentuzumab y de globulina antitimocítica (ATG). Estas metodologías han reducido las tasas de EICH fundamentalmente crónico, pero con un retraso en la reconstitución inmune. Como consecuencia, se ha observado un aumento en la tasa de infecciones virales además de un incremento significativo de la tasa de recaída (Kanda, Int J Hematol 2011; Baron, Haematologica 2017).

A partir de la introducción de los trasplantes haploidénticos se han generado dos modelos similares a los utilizados en el trasplante NR para depleción *in vitro* o *in vivo*. El grupo de la universidad de Johns Hopkins innovó en el modelo de depleción *in vivo* utilizando ciclofosfamida post trasplante (Luznick, Blood 2001). Como se describiera previamente, gracias a su eficacia y bajos costos, hoy es el método más utilizado en la mayoría de los centros (Ciurea, Blood 2015; Kanate, Blood 2016; Kanakry, Nat Rev Clin Oncol 2016; McCurdy, Haematologica 2017).

### **1.7. Complicaciones del trasplante**

El trasplante hematopoyético sigue siendo un procedimiento complejo con una tasa alta de complicaciones a partir de diferentes factores de riesgos. Para describirlo de un modo esquemático, el día del trasplante es denominado día 0. Previamente recibe el acondicionamiento y, en los alogénicos, comienza la inmunosupresión según el tipo de trasplante (a partir del día previo a la infusión hasta el día +3). Habitualmente la caída del recuento de neutrófilos se produce unos días luego de la infusión de CPH y el prendimiento o *engraftment* del injerto varía según el tipo de trasplante y la fuente utilizada.

Dependiendo de la gravedad de las complicaciones el paciente puede sufrir eventos de morbilidad severos como, por ejemplo, requerimiento de intubación orotraqueal (IOT) y asistencia respiratoria mecánica (ARM),, necesidad de vasopresores o de diálisis, eventualmente desencadenando el fallecimiento del paciente. Las complicaciones podrían agruparse en las que causarían la mortalidad asociada al trasplante (MLE) o la recaída/progresión de la enfermedad de base. Finalmente se construyen los eventos de sobrevida: sobrevida global (SG) y sobrevida libre de

enfermedad/progresión (SLE). La SG separa entre los vivos y los fallecidos, mientras que, la SLE, separa entre los vivos sin evidencias de recaída/progresión y los que fallecieron o recayeron/progresaron.

#### 1.7.1. Mortalidad libre de enfermedad

La MLE engloba al evento de mortalidad post trasplante sin evidenciarse recaída o progresión de la enfermedad de base. Por ende reflejaría los eventos de mortalidad a causa del trasplante y no de la patología que lo motivó (Cassileth, NEJM 1998; Alyea, Blood 2005; Scheteling, J Clin Oncol 2008; Wingard, J Clin Oncol 2011).

La probabilidad de que ocurra este evento dependerá de diversos factores de riesgo, descritos más adelante (introducción, 1.8). Sin embargo, el más importante es el tipo de trasplante: los trasplantes autólogos presentan una tasa de MLE muy inferior a los alogénicos. Si bien existen pocos trabajos que planteen esta comparación, los trasplantes alogénicos tendrían una tasa de MLE al menos 3 veces superior en comparación con los trasplantes autólogos (Suciu, Blood 2003).

Las causas principales que conllevan a este desenlace incluyen la toxicidad del régimen de acondicionamiento, las infecciones, el síndrome de oclusión sinusoidal (SOS), el fallo del injerto (entidad exclusiva del trasplante alogénico), la EICH (salvo excepciones es también una entidad exclusiva del trasplante alogénico) y otras menos frecuentes (sangrados y eventos trombóticos).

##### 1.7.1.1. Toxicidad del régimen

El acondicionamiento puede dañar diferentes tejidos. Los órganos afectados con mayor frecuencia son la mucosa intestinal (denominado mucositis), riñones, hígado, pulmones, vejiga, sistema nervioso y cardiovascular. La clasificación más utilizada para graduar esta toxicidad es la de Seattle, que califica la gravedad de 1 a 3 en función de diferentes parámetros órgano específicos (Bearman, J Clin Oncol 1988).

##### 1.7.1.2. Infecciones

En la etapa previa al prendimiento del injerto las infecciones más prevalentes son las bacterianas, fundamentalmente las bacterias Gram negativas (daño en la mucosa intestinal) o Gram positivas (lesiones en piel y asociadas a catéter venoso central). Una vez producida la recuperación hematopoyética se agrega el riesgo de infecciones virales (citomegalovirus [CMV], herpes *simplex* tipo 6) y fúngicas (*aspergillus sp.*,



*pneumocistis jirovecii* y *candida sp.*) (Wingard, Hemat Oncol Clin North Am 2011). En los trasplante alogénicos, debido a la medicación inmunosupresoras y particularmente en el caso de desarrollar EICH que conlleva a altas dosis de esteroides, estos riesgos pueden sostenerse más allá de los primeros 3 meses, sobre todo para las bacterias capsuladas y el *aspergillus sp.*(Bjorklund, Bone Marrow Transplant 2007).

#### 1.7.1.3. Síndrome de oclusión sinusoidal

El SOS se define como la oclusión de los sinusoides hepáticos luego del daño endotelial a partir de metabolitos generados por el acondicionamiento, generando un gradiente de presión post sinusoidal. Ocurre con más frecuencia cuando el paciente recibe un trasplante alogénico con acondicionamiento mieloablatoivo (10-15%) en comparación con el trasplante alogénico con RIC o el trasplante autólogo (5%) (Mohty, Bone Marrow Transplant 2016), La triada clínica característica es la hepatomegalia dolorosa, el aumento de la bilirrubina y el aumento de peso con sobrecarga de líquido (Richardson, Blood 2016)

#### 1.7.1.4. Rechazo del Injerto

Se denomina falla primaria del injerto a la falta de prendimiento de los neutrófilos al día 28 post trasplante (para el caso de UCU día 35). El término secundaria se utiliza cuando una vez alcanzado el prendimiento del injerto, este pierde su función (citopenias severas con médula ósea aplásica). Esta complicación es exclusiva del trasplante alogénico.

En los trasplante de órganos sólidos la incidencia de rechazo es muy alta motivando la necesidad de sostener la inmunosupresión de por vida (Lucey, Liver Transp 2013). En el caso del trasplante hematopoyético, como el sistema inmune del paciente es ablacionado o severamente suprimido, el rechazo es un evento muy infrecuente. Su incidencia es del 4% para los trasplantes histoidénticos (20% en el caso de fuente de UCU). Cuando este evento ocurre, el riesgo de mortalidad es cercana al 50% (Kernan, Blood 1989; Chewning. Biol Blood Marrow Transplant 2007; Ciurea, Blood 2011; Ferra, Leuk Lymphoma 2015; Cluzeau, Bone Marrow Transplant 2016). Esta situación sólo puede resolverse mediante un re-trasplante.

### 1.7.1.5. Enfermedad Injerto contra Huésped

La enfermedad injerto contra huésped (EICH) constituye una de las complicaciones más frecuentes y graves del TCPH. Estudios pioneros postularon los requerimientos para desarrollar EICH (Billingham, Harvey Lect 1967):

- 1) el injerto debe contener células inmunológicamente competentes;
- 2) el receptor debe ser incapaz de montar una respuesta eficaz para destruir las células trasplantadas;
- 3) el receptor debe expresar antígenos tisulares ausentes en el donante.

En el trasplante alogénico de CPH convergen estos requisitos: el injerto contiene linfocitos T maduros inmunológicamente competentes, el receptor ha recibido, previo a la infusión de las CPH, regímenes de acondicionamiento altamente inmunosupresores y, en casi la totalidad de los casos, existe disparidad en los antígenos mayores o menores de histocompatibilidad entre donante y receptor.

Puede presentarse en forma aguda o crónica. Clásicamente, Glucksberg y col. clasificaban la EICH en aguda o crónica según si ocurría antes o después del día +100 post trasplante (Glucksberg, Transplantation 1974). En la actualidad se ha adoptado una clasificación según la presentación clínico-patológica y no por el tiempo transcurrido (Filipovich, Biol Blood Marrow Transplant 2005) (figura 3).

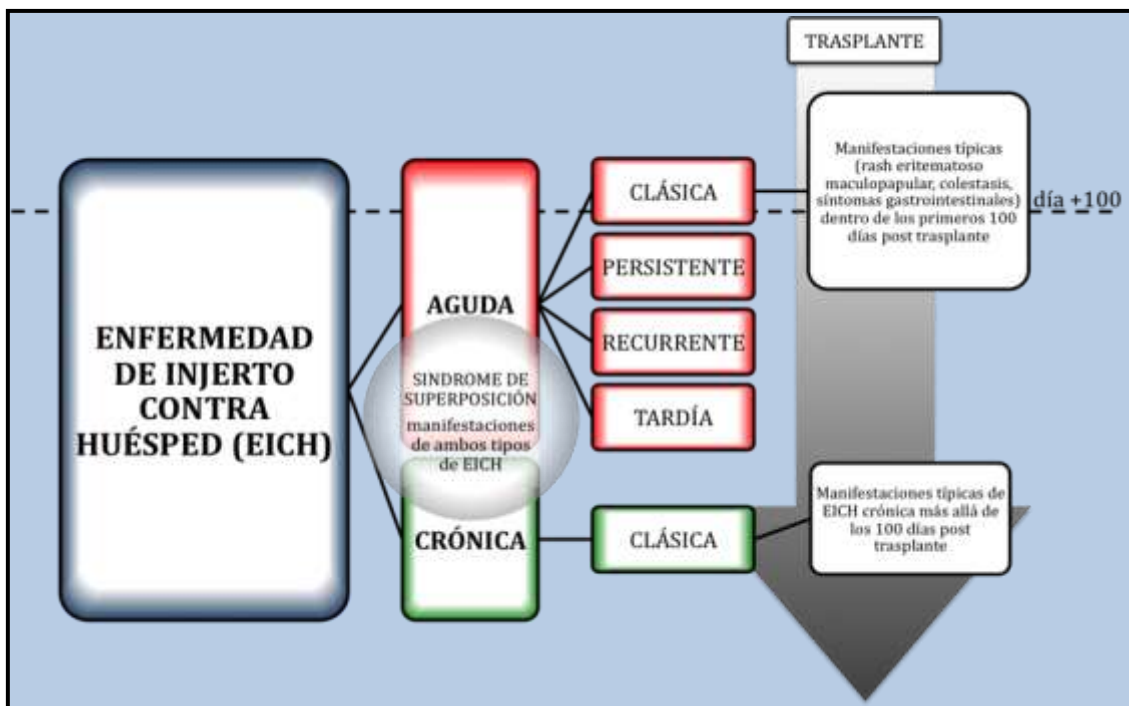


Figura 3. Clasificación de enfermedad de injerto contra huésped (Consenso NIH 2005). La EICH aguda clásica es aquella que ocurre dentro de los primeros 100 días de realizado el trasplante (línea de puntos). La EICH crónica es aquella que se presenta después de ese lapso de tiempo. Existen otras variantes que no se adaptan estrictamente a esta clasificación temporal, por lo que hoy en día se define mejor la EICH por las manifestaciones clínicas sin ser tan determinante la ubicación temporal de éstas manifestaciones.

## EICH Aguda

La EICH aguda (EICHa) generalmente se presenta durante los primeros tres meses posteriores al trasplante, pero puede presentarse más allá de este período (Ringden, Biol Blood Marrow Transplant 2005). La incidencia varía entre el 30-50% (McDonald, Blood 2016; Zeiser, NEJM 2017) según el tipo de donante y los regímenes de acondicionamiento e inmunosupresión utilizados.

Los órganos mayormente afectados son: la piel, el hígado y el tracto digestivo, aunque puede comprometer otros órganos como ojos, mucosa oral o pulmón (Ferrara, Lancet 2009; Zeiser, NEJM 2017). Se clasifica en cuatro estadios dependiendo del compromiso clínico que ocasiona; desde el 0, con la ausencia de enfermedad, hasta el IV donde una afectación pone en riesgo la vida (Tabla 1). A su vez, estos estadios conforman el grado de severidad según la clasificación de Glucksberg en cuatro grados (Couriel, Cancer 2004) (Tabla 2).

Tabla 1. Criterios para la graduación clínica de la Enfermedad de Injerto contra Huésped aguda.

Estadio	Piel	Hígado	Tracto digestivo
0	Ausencia de rash	Bilirrubina <2 mg/dL	Ausencia o diarrea < 500 mL/día
I (leve)	Rash maculopapular <25% de la superficie corporal, sin síntomas asociados	Bilirrubina 2-3 mg/dL	Diarrea 500-1000 mL/día; náuseas y vómitos
II (moderado)	Rash maculopapular o eritema con prurito u otro síntoma asociado que cubre entre 25-50% de la superficie corporal, o descamación localizada	Bilirrubina 3-6 mg/dL	Diarrea 1000-1500 mL/día; náuseas y vómitos
III (severo)	Eritrodermia generalizada o rash maculopapular sintomático o erupción vesicular con formación de algunas flictenas o descamación que cubre ≥50% de la superficie corporal	Bilirrubina 6-15 mg/dL	Diarrea > 1500 mL/día; náuseas y vómitos
IV (muy severo)	Dermatitis exfoliativa generalizada o flictenas generalizadas	Bilirrubina ≥ 15 mg/dL	Dolor abdominal severo, íleo, Sangrado digestivo

Tabla 2. Graduación clínica de la Enfermedad Injerto contra Huésped aguda.

Grado	Estadio		
	Piel	Hígado	Intestino
0	0	0	0
I (leve)	1-2	0	0
II (moderado)	1-3	1	1
III (severo)	2-3	2-3	2-3

La piel es el órgano más frecuentemente comprometido (Ferrara, Lancet 2009). Consiste en un rash maculopapular, a veces pruriginoso o doloroso, que puede estar distribuido por todo el cuerpo. Característicamente comienza en palmas y plantas. En

casos más severos puede presentarse como una eritrodermia (estadio III) y, ocasionalmente formación de flictenas (estadio IV) (Vogelsang, Ann Rev Med 2003).

El compromiso del hígado se manifiesta con hiperbilirrubinemia e incremento de la fosfatasa alcalina y aumento de los niveles de las transaminasas (Couriel, Cancer 2004). La afectación típica del tracto digestivo es la diarrea, que es de carácter secretoria y, ocasionalmente, voluminosa. Además, pueden presentarse otros síntomas como anorexia, dolor abdominal, náuseas y vómitos (Vogelsang, Ann Rev Med 2003). En las formas más severas pueden aparecer intensos dolores cólicos, sangrado digestivo y, finalmente, íleo (estadio IV). Desde el punto de vista fisiopatológico representa una respuesta inflamatoria normal, aunque exagerada, contra antígenos extraños, mediada por los linfocitos del donante (Paczesny, Bone Marrow Transplant 2010). Los órganos más frecuentemente afectados (piel, hígado y tracto digestivo) son aquellos involucrados en la primera línea de defensa antibacteriana y, como tal, gozan de gran cantidad de células presentadoras de antígenos (CPA). En este escenario, los linfocitos infundidos encuentran no sólo un ambiente extraño, sino también las condiciones ideales para activarse, proliferar y actuar.

La fisiopatología de la EICH aguda se suele describir como un fenómeno que se divide en tres fases: (a) generación de un ambiente inflamatorio y activación de las CPA; (b) activación de las células T del donante, seguida de la proliferación y diferenciación; (c) ataque y destrucción de los tejidos del huésped (Markey, Blood 2014; Zieser, NEJM 2017) (figura 4).

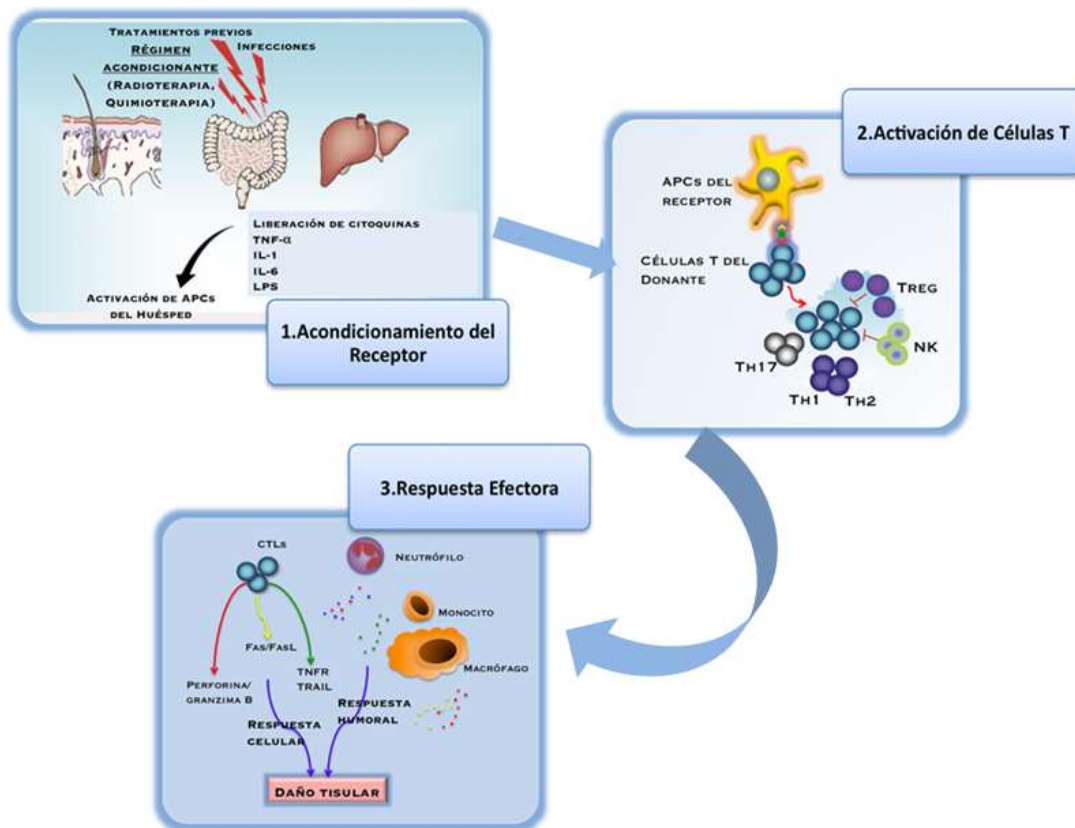


Figura 4. Fisiopatología de la EICH aguda, distinguiéndose las tres fases. TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral-  $\alpha$ ; IL, interleuquina; LPS lipopolisacáridos; APCs, células presentadoras de antígenos; Tregs, T reguladores; Th, T helper; NK, *natural killer*, CTLs, antígeno linfocitario T citotóxico; FAS, proteína de superficie también conocida como CD95; TRAIL, ligando de TNF inductor de apoptosis.

Durante la primera fase, el daño tisular provocado por el acondicionamiento, sumado a las lesiones ocasionadas por la enfermedad de base y su tratamiento, o por las infecciones sufridas, estimula el sistema inmune con la consecuente activación de las CPA. Durante esta etapa se generan gran cantidad de señales de daño que incluyen el aumento de diferentes citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, interferón- $\gamma$  [IFN- $\gamma$ ] y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  [TNF- $\alpha$  por sus siglas en inglés *tumour necrosis factor- $\alpha$* ]), quemoquinas, la expresión de moléculas de adhesión, de co-estimulación y de antígenos HLA (Devetten, Biol Blood Marrow Transplant 2004). Diversos factores pueden contribuir con las diferencias individuales en la extensión y en la severidad de la EICH aguda. Entre ellos, la presencia de polimorfismos en regiones regulatorias de genes involucrados en la respuesta a la injuria anteriormente mencionados (Lin, NEJM 2003; Keen, Blood 2004; Dickinson, immunogenetics 2015; Zeiser, NEJM 2017) (figura 4).

La segunda fase consiste en la activación de linfocitos T del donante por parte de las CPA del paciente. En presencia de señales co-estimuladoras adecuadas y de ciertas citoquinas pro inflamatorias, los linfocitos T del donante son activados, proliferan y se

diferencian a células T efectoras (Paczesny, Bone Marrow Transplant 2010). En esta etapa, la disparidad entre los antígenos HLA cobra mayor relevancia relacionando directamente el grado de incompatibilidad con la severidad de la EICH aguda (Flomenberg, Blood 2004). El avance de las técnicas de genotipificación (alta resolución) han logrado mejoras sumamente importantes en los resultados del TCPH, evidenciando el rol decisivo de otros antígenos, fundamentalmente los antígenos menores de histocompatibilidad (Kaplan, J Immunol 2004; Petersdorf, Best Pract Res Clin Haematol 2017) (figura 4).

En el conjunto de células T infundidas se pueden identificar diversas subpoblaciones con características propias de activación y tipo de respuesta efectora capaz de desplegar. Las particularidades antigénicas del huésped son las que determinarán qué subgrupo prolifera y se diferencia. El predominio de alguno de ellos constituye un nuevo aporte a la variabilidad individual en la presentación clínica de la EICH. De este modo, los linfocitos T CD4+ tipo I (Th1) juegan un rol sobresaliente con la producción de citoquinas como IL-2 e IFN- $\gamma$ , en detrimento de la activación de los T CD4+ tipo II (Th2) productoras de IL-4 e IL-5. Además, la expansión de los Th1 es crítica para la posterior expansión de los linfocitos T CD8+ quienes serán los efectores finales del daño tisular órgano específico (Markey, Blood 2014; Zeiser, NEJM 2017). Otros subtipos de linfocitos T CD4+ han sido descritos en el daño de ciertos órganos, sobre todo piel y pulmón, destacándose los Th17 (Markey, Blood 2014).

Durante la década pasada se ha prestado especial atención a los linfocitos T reguladores (Tregs) definidos como CD4+/CD25+ que expresan el factor de transcripción nuclear FOXP3. Los Tregs jugarían un rol vital en el control regulatorio de la respuesta inflamatoria que se genera en la EICH (Hess, Biol Blood Marrow Transplant 2006; Rezvani, Blood 2006, Markey, Blood 2014). Estudios experimentales realizados en modelos murinos han demostrado que estas células tienen la capacidad de suprimir la proliferación de los linfocitos T convencionales, previniendo el desarrollo de la EICHa.

Los mecanismos a través de los cuales se logra inducir tolerancia son desconocidos, e incluso diferentes trabajos han mostrado resultados opuestos (Stanzani, Blood 2004; Li, Leuk Res 2010). Se piensa que la capacidad inmunosupresora de los Tregs es mediante el contacto célula-célula y a través de la secreción de citoquinas como IL-10 y del factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1 por sus siglas en inglés *Transforming growth factor*- $\beta$ 1) (Nakamura, J Exp Med, 2001). Además se ha

correlacionado los niveles séricos de TGF- $\beta$ 1 con la cantidad de Tregs en el producto de CPH infundido: a mayor número de Tregs mayores niveles de TGF- $\beta$ 1). Por otro lado, se ha observado que la cantidad de Tregs del donante puede predecir qué pacientes tendrían mayor riesgo de desarrollar EICH aguda (Li, Leuk Res 2010).

Durante la tercera fase o fase efectora, se produce la lesión en el órgano blanco. El daño puede ser mediado por células a través de una actividad citotóxica directa o mediante la producción de citoquinas inflamatorias (figura 4) (Devetten, Biol Blood Marrow Transplant 2004; Ferrara, Lancet 2009; Paczesny, Bone Marrow Transplant 2010). Para ejercer esta función, los componentes celulares, básicamente los linfocitos T citotóxicos (CD8), necesitan establecer un firme contacto célula-célula. A través de esta interacción se ponen en juego mecanismos cuyo objetivo final es la muerte celular. Entre ellos se destacan las vías de señalización que involucran la interacción Fas-FasL (molécula de superficie conocida como CD95 con su respectivo ligando CD95L), perforinas-granzima B o la vía TNFR/TRAIL (ligando de TNF inductor de apoptosis).

La respuesta humoral no necesita de esa interacción estrecha célula-célula para mediar el efecto citotóxico, sino que el daño celular es amplificado por la producción de diferentes citoquinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , óxido nítrico e IL-1). Entre estas moléculas se destaca el TNF- $\alpha$  que es producido por macrófagos, células T y células NK. Existe suficiente evidencia acerca del rol de TNF- $\alpha$  en el desarrollo y severidad de la EICH aguda, particularmente, la afectación cutánea (Kaplan, J Immunol 2004).

Entre los avances importantes en esta área durante los últimos años se encuentran la identificación de biomarcadores y el rol de la microbiota. En el campo de los biomarcadores se destaca el marcador regenerador derivado de islote-3 alfa (reg3alfa). Esta molécula, presente en las células de Paneth de la mucosa intestinal, ha demostrado una alta sensibilidad para el diagnóstico de la EICHa intestinal y, a su vez, ser un marcador pronóstico de severidad (Ferrara, Blood 2011). En cuanto al rol de la microbiota, el uso de antibióticos de amplio espectro en el período previo al prendimiento del injerto genera un desequilibrio de la flora (aumento de enterobacterias y enterococos con reducción de lactobacilos y clostridios). Esto provoca una reducción en la acetilación de histonas de las células epiteliales y disminución de los Tregs favoreciendo el desarrollo de EICHa (Peled, Blood 2016).

## *EICH Crónica*

Originalmente, la EICH crónica se clasificaba en limitada o extensa en función de la cantidad y la distribución de los órganos afectados. A partir de 2005, se comenzó a utilizar la clasificación del Instituto Nacional de Salud estadounidense (NIH, por sus siglas en inglés *National Institute of Health*) que agrupa a la patología en tres estadios: leve, moderado y severo en función de los órganos afectados, la extensión y la severidad (Filipovich, *Biol Blood Marrow Transplant* 2005). Comúnmente compromete piel, mucosas, ojos, articulaciones, fascias, hígado, pulmón y aparato genitourinario.

La forma de presentación de la EICH crónica es considerablemente diferente a la del agudo. Las manifestaciones clínicas remedan a diferentes entidades autoinmunes como esclerodermia, síndrome de Sjögren, fibrosis pulmonar, y hepatitis autoinmune entre otras. En la mayoría de los casos, predomina el componente fibrótico (Arora, *Best Pract Res Clin Haematol* 2008; Arai, *Biol Blood Marrow Transplant* 2015)..

Como contrapartida a la EICH aguda, el entendimiento de la fisiopatología de la EICH crónica presenta un gran obstáculo ante la falta de modelos murinos que simulen la situación clínica en los humanos. Recientemente se desarrollaron dos modelos que se acercan a la realidad de esta complicación. El primero refiere un escenario sistémico agresivo con compromiso multiorgánico incluyendo al pulmón. En este modelo se concluyó que la fibrosis pulmonar y hepática se asocian a una infiltración por células T CD4+, células B CD20+ y depósito de alo anticuerpos (Srinivasan, *Blood* 2012). El segundo de ellos, desarrollado por Wu y col., describe una transición entre EICH aguda a EICH crónica esclerodermiforme con compromiso de glándulas salivares y auto-anticuerpos (Wu, *J Immunol* 2013).

Clásicamente se había definido a la EICH crónica como un fenómeno Th2 (Coghill, *Blood* 2011). En la actualidad se han agregado los linfocitos Th17 y, al igual que para la EICH aguda, los Tregs (MacDonald, *Biol Blood Marrow Transplant* 2018). Pacientes con EICH crónica tienen significativamente menos Tregs circulantes que los pacientes sin EICH crónica (Zorn, *Blood* 2005). Estos hallazgos han permitido avanzar en la comprensión de la fisiopatología de la EICH crónica. Sus manifestaciones serían la consecuencia de un fenómeno inmune complejo que incluye linfocitos B y T del donante, así como otros tipos celulares como los macrófagos con una fuerte estimulación de procesos fibróticos (Socié, *Blood* 2014).

En cuanto al factor humoral y su acción fisiopatológica en la EICH crónica, se han descrito dos tipos de anticuerpos: contra antígenos no presentes en el donante (ej.



cromosoma Y) y los anticuerpos contra antígenos solubles (ej. factor de crecimiento plaquetario). Estos últimos antígenos estimulan la expresión de genes vinculados con el colágeno tipo 1.

Por otro lado, se estudió la asociación entre variantes genéticas en citoquinas del donante y la generación de EICH crónica. A través de técnicas de expresión génica se han logrado identificar aquellos donantes que serían hiperrespondedores y aquellos que serían más inmunotolerantes (Baron, PlosMed 2007). Los genes implicados fueron los que cumplen funciones en la proliferación celular y aquellos que regulan el sistema inmune como, por ejemplo, *TGFBI*.

### 1.7.2. Recaída

La recaída es el otro gran causante de un mal desenlace del trasplante. La tasa de recaída dependerá de diversos factores de riesgo, descritos a continuación (ver introducción 1.8), que fundamentalmente se resumen en la patología de base (junto con características genéticas de la enfermedad), el estado de la enfermedad previo al trasplante (ver 1.8.3) y el acondicionamiento utilizado (1.8.5).

## **1.8. Factores de Riesgo asociados a complicaciones post trasplante**

### 1.8.1. Compatibilidad genética

La compatibilidad en el HLA entre receptor y donante es el principal factor de riesgo para el trasplante alogénico. En términos generales, los donantes histoidénticos relacionados tienen mejores tasas de supervivencia y los trasplantes NR aumentan el riesgo de mortalidad a medida que aumenta el número de incompatibilidades (Pidala, Blood 2014; Petersdorf, Best Pract Res Clin Haematol 2017). Sin embargo, este concepto se encuentra en revisión a la luz del trasplante haploidéntico.

### 1.8.2. El estado del paciente al momento del trasplante:

- Edad: si bien hay controversia en este punto, a mayor edad, mayor riesgo de complicaciones. Su influencia ha sido demostrada tanto para trasplante autólogo (Poplewell, Bone Marrow Transplant 2002; Bierman, Ann Oncol 2002; Jantunen, Haematologica 2008; Chen, Biol Blood Marrow Transplant 2015) como para trasplante alogénico (Gratwohl, Lancet 1998; Gratwohl, Best Pract Res Clin Haematol 2007; Deeg, Blood 2010, Nivison-Smith, Inter Med J 2011; Pidala, Blood 2014). Este concepto ha cambiado en las últimas décadas y se ha

elevado la edad límite para indicar un trasplante alogénico, sobre todo a partir de la introducción de los RIC (Finke, *Leukemia* 2007; Michells, *Bone Marrow Transplant* 2015).

- Sexo: no hay una clara asociación entre el sexo del paciente y los resultados del trasplante. Algunos estudios han asociado el sexo masculino con peores resultados luego del trasplante autólogo (Alegre, *Bone Marrow Transplant* 1998; Chen, *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; Kako, *Am J Hematol* 2015; Smeland, *Br J Haematol* 2016) y alogénico (Armand, *Blood* 2012; Kako, *Am J Hematol* 2015; Kim, *Haematologica* 2016).
- Serología para CMV: la seropositividad para CMV tiene una prevalencia de más del 60% en los pacientes que reciben un trasplante de CPH, al igual que en sus donantes. La incompatibilidad serológica para CMV (receptor IgG+/donante IgG- o viceversa) se asociaría con una reducción en la supervivencia post trasplante alogénico con donante NR (Shaw, *Bone Marrow Transplant* 2017).
- Comorbilidades: el grupo del *Fred Hutchinson Cancer Center* en Seattle, liderados por Sorror y col., describió un método de puntaje que evalúa diferentes comorbilidades en función de cómo éstas afectan los resultados del trasplante (Sorror, *Blood* 2005) (tabla 3). Este sistema, denominado índice de comorbilidades específico de trasplante hematopoyético (HCT-CI por sus siglas en inglés *Hematopoietic Cell Transplant-Comorbidity Index*), agrupa a los pacientes en riesgo bajo (RB) si el puntaje es 0, riesgo intermedio (RI) si el puntaje es entre 1 y 2 y alto riesgo (RA) con puntaje mayor a 2. Originalmente descrito para trasplante alogénico, desde entonces ha sido utilizado para evaluar, sobre todo, el riesgo de MLE en diversas series (Barba, *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; Nakaya, *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; Michells, *Bone Marrow Transplant* 2015).

Tabla 3. Comorbilidades incluidas en el score HCT-CI

Comorbilidad	Definición	Puntaje
Arritmia	Fibrilación auricular o <i>flutter</i> , enfermedad del seno, arritmias ventriculares	1
Cardíaca	Enfermedad coronaria, congestiva, infarto de miocardio o fracción de eyección menor al 50%	1
Enf. inflamatoria intestinal	Enf. de Crohn o colitis ulcerosa	1
Enf. Cerebrovascular	Accidente isquémico transitorio o ACV	1
Psiquiátrica	Depresión o ansiedad que requiera tratamiento	1
Hepática leve	Hepatitis crónica, bilirrubina VSN-1,5x o enzimas hepáticas VSN-2,5x	1
Obesidad	IMC >35kg/m <sup>2</sup>	1
Infección	Que requiera tratamiento antimicrobiano el día del trasplante	1
Reumatológica	Lupus Eritematoso Sistémico, Artritis reumatoidea, polimiositis, mixta del tejido conectivo, polimialgia reumática	2
Úlcera péptica	Que haya requerido tratamiento	2
Renal moderada/severa	Creatinina >2 mg/dL, diálisis o trasplante renal previo	2
Pulmonar moderado	DLco y/o VEF1 66%-80% o disnea clase funcional II	2
Tumor sólido previo	Excluyendo cáncer de piel no melanoma	3
Enf. Valvular	Excluyendo prolapso mitral	3
Pulmonar severa	DLco o VEF1 ≤65% o disnea al reposo o necesidad de oxígeno	3
Hepático moderado/severo	Cirrosis, bilirrubina >1,5x VSN o enzimas hepáticas >2,5x VSN	3

Enf. Enfermedad; ACV: accidente cerebro vascular; VSN: valor superior normal; IMC: índice de masa corporal; DLco: difusión del monóxido de carbono; VEF1: volumen espiratorio forzado.

### 1.8.3. Enfermedad de base y *status* pre-trasplante

La enfermedad de base y el estado de la misma previo al procedimiento (conocido como *status* pre trasplante) implican dos hechos altamente asociados sobre todo al riesgo de recaída post trasplante. La herramienta que mejor evalúa estos parámetros en el trasplante alogénico es el puntaje del índice de riesgo de enfermedad (DRI por sus siglas en inglés *disease risk index*) (Armand, Blood 2012). Combina la enfermedad que motivó el trasplante, las características citogenéticas/moleculares de la misma con el *status* pre trasplante. De este modo, se agrupa a los pacientes en riesgo bajo, intermedio, alto y muy alto, logrando establecer diferencias en estos 4 grupos como predictores del riesgo de sobrevida libre de enfermedad (fuerte asociación con la recaída) y la sobrevida global. El mismo grupo redefinió el índice a partir de ciertos ajustes de variables combinadas entre patología y *status* (Armand, Blood 2014).

Otra forma simplificada de categorizar los pacientes previo a un trasplante alogénico es clasificarlos en estadios tempranos y tardíos. Los tempranos corresponden a las leucemias agudas en primera remisión completa, síndromes mielodisplásicos en remisión completa, leucemia mieloide crónica en primera fase crónica y AAS como primera línea de tratamiento; mientras que, el resto de los pacientes se encuentra en estadios tardíos (Barret, Expert Rev Hematol 2010).

#### 1.8.4. Características del donante

Se han descrito varios aspectos propios del donante (más allá de la compatibilidad HLA) como posibles factores asociados a los resultados del trasplante. Entre ellos se destacan los siguientes:

- Edad: a menor edad del donante, menor riesgo de EICH y mayor probabilidad de supervivencia (Confer, Biol Blood Marrow Transplant 2010; Shaw, Biol Blood Marrow Transplant 2018).
- Sexo y paridad: Se considera mejor donante a los varones, sobre todo, en el caso de que las potenciales donantes mujeres hayan tenido embarazos. Este factor se basa en la sensibilización que ocurre luego de un embarazo por la exposición a antígenos del feto en las madres gestantes y es más influyente cuando una mujer dona a un varón (Loren, Biol Blood Marrow Transplant 2006; Wang, Leukemia 2017).
- Serología para CMV (ver CMV en características del paciente, 1.8.2).

#### 1.8.5. Acondicionamiento utilizado (ver introducción 1.6)

## **2. Factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1**

### **2.1. Generalidades**

TGF- $\beta$ 1 es miembro de una familia de factores de crecimiento junto con TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. Se define como una molécula altamente pleiotrópica, involucrada en la regulación de numerosos procesos de inmunomodulación (Johnston, Cell Immunol 2016). La principal fuente de TGF- $\beta$ 1 son los linfocitos T y las plaquetas, aunque se ha visto que pueden ser secretados por otras células como, por ejemplo, células epiteliales, endoteliales y fibroblastos (Blobe, N Eng J Med 2000). Su acción es mediada por la activación de factores de transcripción conocidos como Smad (por sus siglas en inglés *Small mother against decapentaplegic*) activados luego de la unión de TGF- $\beta$ 1 con su receptor TGF- $\beta$ RI y II.

TGF- $\beta$ 1 inhibe la proliferación y activación de linfocitos T efectores, disminuye la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en Th1 y Th2, mientras que promueve la diferenciación a Tregs inducido (iTregs) y Th17 (Bouche, Clin Transl Immunology 2017; Bommireddy, Trends Mol Med 2007; Li, Immunity, 2007). En la ausencia de IL6, TGF- $\beta$ 1 promueve la diferenciación de Th *naive* a iTregs (Li, Cell 2008; Zheng, J

Immunol 2002), el aumento de la expresión de FOXP3 (Letterio, Oncogene 2005) y juega un papel importante en la función inmunosupresora de los Tregs, ya sea por medio de la secreción de TGF- $\beta$ 1 o por su expresión en membrana (Nakamura, J Exp Med 2001; Zheng, J Immunol 2002; Li, Immunity 2007; Savage, J Immunol 2008). En presencia de IL6 promueve la diferenciación de Th *naive* a Th17 (Johnston, Cell Immunol 2016) (figura 5).

Recientemente se describieron dos nuevas acciones inmunológicas de TGF- $\beta$ 1. En primer lugar, el posible vínculo entre TGF- $\beta$ 1, el epitelio intestinal, la microbiota y el sistema inmune. En este ámbito, ciertos patógenos como el *Bacterioides fragilis* y algunos subtipos de *Clostridium* inducirían la diferenciación y proliferación de Tregs a través de la secreción de TGF- $\beta$ 1 por parte de las células epiteliales, a la vez que promovería la integridad de la mucosa (Troncone, Front Immunol 2018). De la misma manera induciría células linfoides innatas tipo 1 y 3 reduciendo la activación de Th1 y Th2 (Bouche, Clin Transl Immunology 2017). En segundo lugar, el rol de TGF- $\beta$ 1 en la diferenciación de Th *naive* en Th9. Este nuevo subtipo de Th se ha asociado a cierta inmunotolerancia y actividad anti-tumoral, pero también a fenómenos autoinmunitarios y su diferenciación sería gatillada por TGF- $\beta$ 1 en presencia de IL-4 (Li, Cytokine Growth Factor Rev 2017) (figura 5).

Más allá de su función sobre el sistema inmunológico, la otra característica distintiva de TGF- $\beta$ 1 es su acción profibrótica (Anscher, N Eng J Med 1993; Meng, Nat Rev Nephrol 2016). La activación por parte de TGF- $\beta$ 1 de Smad 2 y Smad 3, junto con la inhibición de Smad7, desencadenaría el proceso fibrótico. Los fibroblastos son activados y atraídos al sitio de injuria. Allí proliferan y producen colágeno, y, por otro lado, inhiben la producción de metaloproteasas (Hu, Chem Biol Interact 2018). Algunos autores han asociado este mecanismo a la secreción de TGF- $\beta$ 1 por parte de las plaquetas (Ghafoory, Blood Advances 2018) (figura 5).

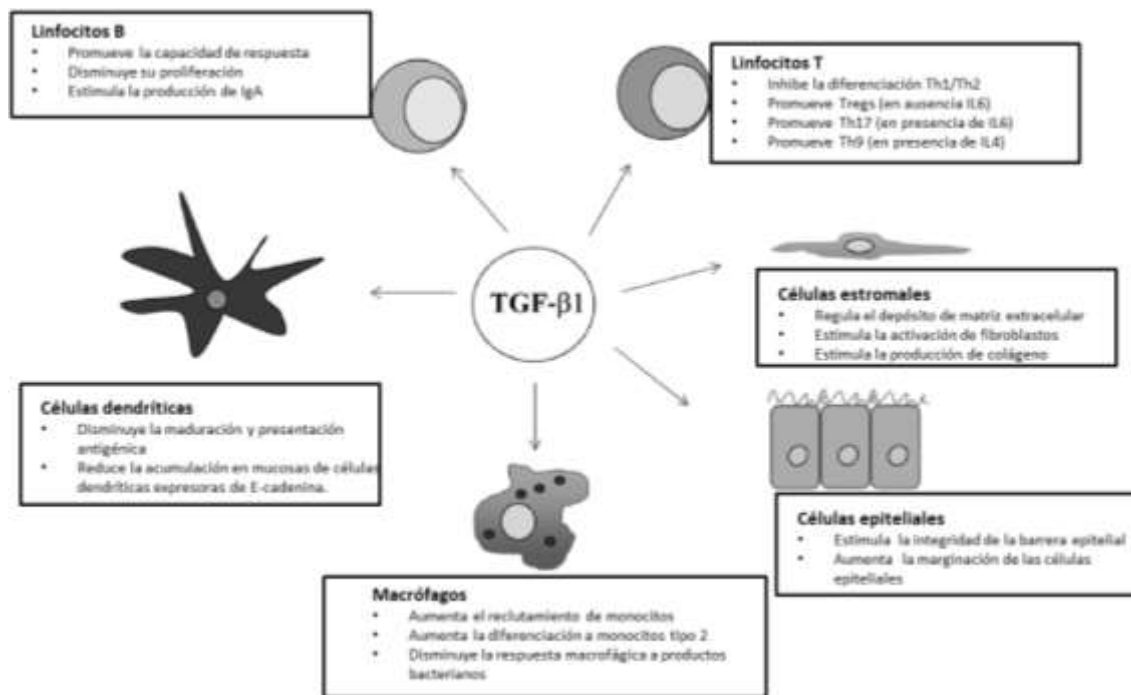


Figura 5. Se describe de un modo esquemático las principales acciones de TGF-β1 sobre linfocitos, macrófagos, células estromales, epiteliales y dendríticas. Adaptado de Troncone, Front Immunol 2018.

## 2.2. Proceso de secreción

TGF-β1 es traducido como una pre-pro-proteína conformada inicialmente por 390 aminoácidos (figura 6). En la parte amino-terminal se encuentra el péptido señal conformado por 29 aminoácidos, el cual es clivado en las etapas tempranas del proceso. La pro-proteína remanente, constituida por el péptido conocido como LAP (por sus siglas en inglés *latency associated protein*) que comprende los aminoácidos 30 al 278, y la forma activa de TGF-β1 compuesta por 112 aminoácidos es secretada al medio (Dubois, J Bio Chem 1995; Annes, J Cell Science 2003). Homodímeros de LAP permanecen unidos por enlaces no covalentes a homodímeros de la proteína madura y son liberados antes de la interacción con el receptor (Assoian, J Biol Chem 1983; Li, Cell 2008). Este proceso se ve afectado por las condiciones del medio como la temperatura y el pH extremos (Annes, J Cell Science 2003). El LTBP (por sus siglas en inglés *latent-TGF-β-binding protein*) se une al complejo LAP-TGF-β1, participa en su secreción hacia la matriz extracelular y se cree que mientras se encuentran asociados, TGF-β1 no es activable (figura 6).

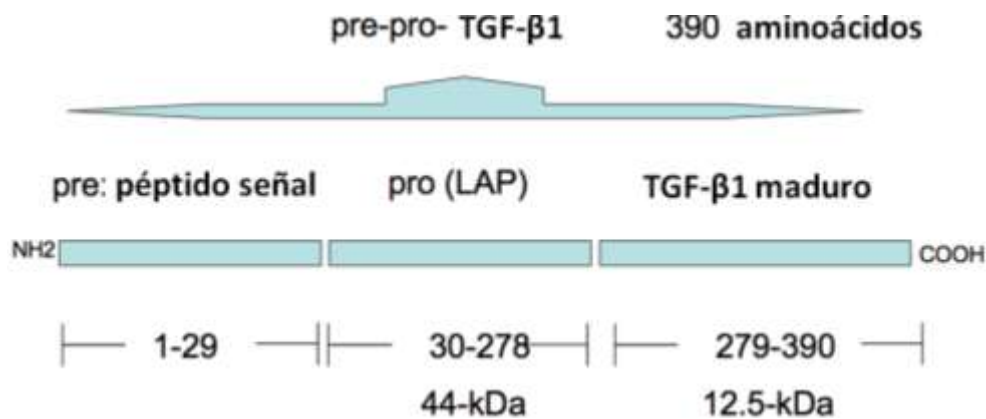


Figura 6. Esquema de la secreción de TGF-β1, Inicialmente es traducido como pre-pro-proteína. LAP, proteína asociada de latencia; kDa, kilodaltons.

El péptido señal no es exclusivo de TGF-β1, ya que estaría presente en casi todos los pre-péptidos secretados y fue descrito, entre otros, por Milstein y col. (Milstein, Nat New Biol 1972; Davis, Nature 1980). Este péptido contiene, a su vez, un dominio o *core* habitualmente formado por 8-15 aminoácidos altamente hidrofóbicos, cuya función es la de orientar la proteína en la membrana del retículo endoplásmico rugoso durante las primeras etapas de la traducción (Perlman, J Mol Biol 1983; Derynck, Nature 1985).

Habitualmente el *core* comienza luego de un residuo con carga positiva (lisina o arginina). Con respecto a su composición, los residuos más frecuentes son leucina, alanina y valina. La leucina habitualmente ocupa casi la mitad de los residuos. La presencia de aminoácidos de carga neutra como prolina, glicina o serina son infrecuentes y, generalmente, se ubican al principio o al final; su presencia puede modificar una estructura secundaria de alfa-hélice o beta-plegada. En los residuos que se encuentran luego del *core*, pero dentro del péptido señal, se encuentra el punto de clivaje. Se propone que éste se produce luego de un triplete AXB, siendo A habitualmente alanina, X cualquier aminoácido de carga neutra y B alanina o glicina, entre otros (Perlman, J Mol Biol 1983).

### 2.3. Variantes polimórficas del gen *TGFBI*

El gen *TGFBI* se encuentra localizado en el cromosoma 19q13.1-q13.3 y contiene 7 exones. Diferentes polimorfismos han sido identificados en la región comprendida entre las posiciones -2665, la región promotora, hasta la +423 (Shah, Hum Genet 2006). Entre los más destacados se encuentran cuatro polimorfismos de un único nucleótido (SNP por siglas en inglés *single nucleotide polymorphism*) (figura 7). Los

dos primeros están localizados en la región promotora: c.-1638G>A (notación legada como -800) y c.-1347C>T (notación legada como -509). Los dos restantes, ubicados en el exón 1, generan un cambio en el aminoácido codificado y son c.29C>T, p.P10L (notación legada como +29 o codón 10) y c.74G>C, p.A25P (notación legada como +74 o codón 25) (Grainger, Hum Mol Genet 1999; Shah, Hum Genet 2006; Amani, Int J Immunog 2008; Berndt, Carcinogenesis 2007).

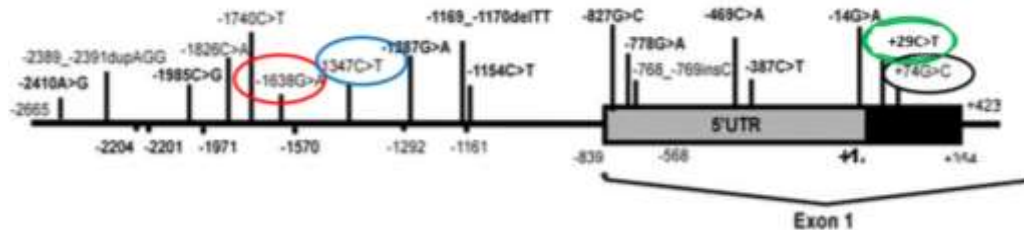


Figura 7. Esquema de los polimorfismos de la región promotora del gen *TGFBI*. Los más frecuentemente estudiados se destacan en círculos: rojo -800, azul -509, verde +29 y negro +74). Adaptado de Shah, Hum Genetics 2006.

Estos últimos polimorfismos se localizan en el péptido señal y la presencia de variantes alterarían la secreción de la citoquina (figura 8). El cambio en la posición +29 de una citosina por una timina resulta en un cambio de una prolina (aminoácido de carga neutra) por una leucina (aminoácido altamente hidrofóbico), pudiendo alterar de esta manera la estructura secundaria del *core* del péptido señal y, por lo tanto, el proceso de secreción. Mientras que, el polimorfismo +74 conlleva al cambio de una arginina por una prolina en una posición cercana al punto de clivaje del péptido señal.

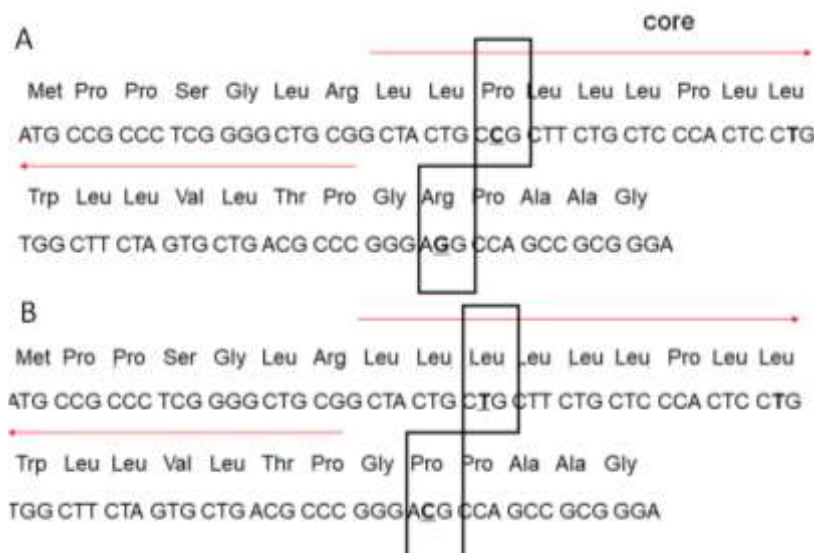


Figura 8. Representación del péptido señal del gen *TGFBI*. El *core* comienza luego de una arginina, tiene un alto contenido de leucinas e incluye el triplete de clivado al final del péptido. A: se recuadran las posiciones +29 c.C p.10Pro y +74 c.G p.25Arg. B: se recuadran las variantes polimórficas, tanto a nivel de la secuencia nucleotídica como en los aminoácidos codificados, +29 c.T p.10Leu y +74 c.C p.25Pro. En negrita se resaltan las variantes polimórficas.



Con respecto a la asociación entre estos polimorfismos y los niveles plasmáticos, se han observado resultados encontrados, sobre todo en lo que respecta al SNP +29. La mayoría de ellas coincide en definir el alelo C como el de alta producción (Yamada, J Bone Miner Res, 1998; Awad, Transplantation, 1998; Yokota, Circulation, 2000; Ziv, JAMA, 2001; Gewaltig, Clin Chim Acta, 2002; Dunning, Cancer Res, 2003; Mak, Cytokine, 2007). En cuanto al SNP +74 hay más consenso y relacionan a la presencia del alelo G con su mayor secreción (Awad, Transplantation 1998; Gewaltig, Clin Chim Acta 2002). Numerosos trabajos han asociado estos polimorfismos con susceptibilidad a diferentes patologías entre ellas, autoinmunes (Zhang, Mol Biol Rep 2013), hipertensión arterial (Xi, Mol Biol Rep 2012), cáncer de mama (Qiu, Breast Cancer Res Treat 2010), cáncer de colon (Berndt, Carcinogenesis, 2007) y tolerancia post trasplante de órgano sólido (Ge, PLoS One 2014).

#### **2.4. Rol de TGF- $\beta$ 1 en el TCPH**

Diferentes estudios han demostrado la asociación de TGF- $\beta$ 1 y EICH. El grupo australiano de Banovic y col. estudió el rol de TGF- $\beta$ 1 en un modelo de EICH murino de trasplante hematopoyético mieloablativo, donde los donantes eran inducidos con factor estimulantes de colonias (G-CSF por sus siglas en inglés *granulocyte-colony stimulating factor*). La principal fuente de producción de TGF- $\beta$ 1 en el período post trasplante inmediato fueron las células T del donante. El bloqueo de la molécula provocó un incremento significativo en la severidad de la EICH aguda mediante un incremento en la proliferación de linfocitos T y la secreción de IFN- $\gamma$ . De modo contrario, en el período más alejado del trasplante (luego de dos semanas), TGF- $\beta$ 1 era predominantemente producido por células mononucleares y su bloqueo produjo una disminución en la incidencia de EICH crónica demostrando el efecto profibrótico (Banovic, Blood 2005).

El grupo brasilero encabezado por de Souza estudió, mediante ELISA, los niveles de citoquinas en el suero de 13 pacientes sometidos a un trasplante alogénico histoidéntico. Encontraron que los niveles de IL-2R soluble y de IL-10 estaban significativamente aumentados en los pacientes que desarrollaron EICH aguda. Contrariamente, los niveles de TGF- $\beta$ 1 estaban significativamente disminuidos en este grupo de pacientes. Estos autores concluyeron que el balance de citoquinas pro-antiinflamatorias derivadas de Th1 y Th2 probablemente juegue un rol importante en la génesis de EICH (Laguila Visenteiner, Experim Hematol 2003). En una línea similar, el

grupo Australiano definió el rol central de TGF- $\beta$ 1, en conjunto con otras citoquinas como IL6 o IL2, para la diferenciación en Th17 o Tregs inducidos, ambos subtipos de CD4 también involucrados en la génesis de EICH aguda y crónica (Markey, Blood 2014).

Liem y col, mediante la misma técnica de medición de los niveles de TGF- $\beta$ 1 por ELISA en pacientes post trasplante alogénico relacionado, describieron la cinética de secreción de la citoquina. Luego del acondicionamiento TGF- $\beta$ 1 disminuía a valores cercanos al cero con un valle en el período pre-prendimiento para después aumentar paulatinamente. Los autores analizaron esta cinética junto a la producción celular y encontraron una correlación positiva significativa entre los niveles de la citoquina y la recuperación hemopoyética de plaquetas y glóbulos blancos, así como con la incidencia de EICH crónica, confirmando las propiedades profibróticas de la molécula (Liem, Transplantation 1999).

Recientemente, un grupo de China, estudió la correlación entre la presencia de Tregs y los niveles de TGF- $\beta$ 1 y TNF- $\alpha$  en el período posterior al prendimiento del injerto, con la incidencia de EICH aguda luego de un trasplante alogénico. Los pacientes que desarrollaron EICH aguda, presentaron una disminución significativa de los niveles de Tregs, en comparación con los que no desarrollaron la complicación y a menor nivel de TGF- $\beta$ 1, mayor incidencia y severidad de EICH aguda, Contrariamente, los niveles de TNF- $\alpha$  se encontraron incrementados en los pacientes que desarrollaron la complicaciones (Li, Leuk Res 2010).

Teniendo en cuenta que la compatibilidad HLA entre los pacientes y donantes no elimina por completo la posibilidad de desarrollar EICH, como se mencionara previamente, Baron y col. estudiaron el perfil de expresión génica de diferentes citoquinas de los donantes mediante micromatriz (microarray en inglés). El grupo de donantes de “alto riesgo” (aquellos donantes cuyos receptores desarrollarían EICH crónica) presentaban un perfil de regulación de los genes de la vía de señalización de TGF- $\beta$ 1 modificado (Baron, PlosMed 2007).

Siguiendo la hipótesis de que patrones genéticos, tanto en paciente como en donantes, pueden influir el resultado del trasplante y, a la vez, teniendo en cuenta la relación entre los niveles de TGF- $\beta$ 1 y EICH, algunos grupos estudiaron la asociación entre polimorfismos del gen *TGFBI* y el desarrollo de esta complicación (Leffel, Transplant Proc 2001; Hattori, Bone Marrow Transplant 2002; Laguila Visenteiner, Cytokine 2005; Noori-Daloi, Ann Transplant 2007; Xiao, Biol Blood Marrow

Transplant 2011). Los trabajos con un número reducido de trasplantes han vinculado la presencia del alelo T, en pacientes o donantes, con menor incidencia de EICH aguda (Leffel, Transplant Proc 2001; Hattori, Bone Marrow Transplant 2002; Noori-Dalooi, Ann Transplant 2007). Aquellos análisis con poblaciones superiores a cien pacientes no han encontrado una asociación entre el polimorfismo y la EICH aguda (Laguila Visenteiner, Cytokine 2005; Xiao, Biol Blood Marrow Transplant 2011) o han vinculado a los receptores TT con un incremento del riesgo de EICHa severa y EICH crónica (Dukat-Mazurek, Hum Immunol 2017). Únicamente Xiao y col. evaluaron la asociación de SNP +29 y la supervivencia luego del trasplante alogénico relacionado sin hallazgos relevantes y no analizaron la posible asociación con MLE (Xiao, Biol Blood Marrow Transplant 2011).

# **OBJETIVOS**

De acuerdo a lo expuesto y teniendo en cuenta que el éxito del trasplante engloba diversos factores que incluyen tanto variables propias del procedimiento como del paciente y su respectivo donante, el **objetivo general** de la presente tesis consiste en estudiar el impacto de variables clínicas e inmunogenéticas sobre la morbi-mortalidad post trasplante

Por lo tanto los **objetivos específicos** abarcan:

- Evaluar el efecto de las diversas variables clínicas que influyen el éxito del TCPH analizando poblaciones de nuestro medio.
  
- Determinar el valor pronóstico de la presencia de comorbilidades según el *score* HCT-CI en trasplantes realizados en nuestro medio, en particular en el trasplante autólogo y en pacientes mayores sometidos a un trasplante alogénico.
  
- Analizar polimorfismos funcionales del gen *TGFBI* y su relación con las complicaciones y/o éxito del trasplante alogénico, tanto con donantes relacionados como con donantes no relacionados.
  
- Realizar estudios funcionales con la finalidad de abordar el mecanismo fisiopatológico de estos polimorfismos en el período post trasplante alogénico.

## **HIPÓTESIS**

### ***Hipótesis principal***

*Las características del paciente, tanto clínicas como inmunogenéticas, el origen de los progenitores y las particularidades del procedimiento impactan en las complicaciones post trasplante hematopoyético.*

### ***Hipótesis secundarias***

- El número de comorbilidades del paciente incrementa de manera proporcional los parámetros de morbi-mortalidad post trasplante de células progenitores hematopoyéticos autólogos y alogénicos.
- La presencia de variantes polimórficas del gen *TGFBI* influye en los resultados del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas alogénico al afectar el proceso de secreción de la citoquina.
- La susceptibilidad al desarrollo de complicaciones se pone de manifiesto en el microambiente desbalanceado producto de las características propias del procedimiento al incidir en la capacidad biológica de los Tregs.

# **MÉTODOS**

## **CAPITULO 1. EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE LAS VARIABLES CLÍNICAS EN LA MORBIMORTALIDAD DEL TCPH**

### **1. Poblaciones**

#### **1.1. Trasplantes Autólogos de CPH**

##### 1.1.1. Impacto de las variables clínicas en el trasplante autólogo

Se analizó de manera retrospectiva una cohorte de 1730 pacientes adultos sometidos a trasplante autólogo de CPH desde octubre/2002 hasta agosto/2016 con un mínimo de seguimiento de 100 días (media de seguimiento de 1,15 años). Los datos fueron solicitados a diferentes centros de trasplante pertenecientes al Grupo Argentino de Trasplante de Médula Ósea (GATMO). Los centros participantes fueron: Hospital Universitario Austral, Instituto Alexander Fleming, Hospital Italiano de Buenos Aires, Hospital Italiano La Plata, FUNDALEU, Hospital Británico de Buenos Aires, Hospital Alemán, Sanatorio Anchorena, Hospital Privado de Córdoba y Fundación Favaloro.

Con el objetivo de evaluar factores de riesgo y de validar el índice HCT-CI en el contexto del trasplante autólogo, los datos clínicos requeridos fueron: edad, sexo, enfermedad de base (neoplasias hematológicas: mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemia mieloblástica aguda. neoplasias no hematológicas: tumores germinales, neuroblastoma, meduloblastoma, sarcoma de Ewing y osteosarcoma, entre otros). Se consideró el *status* de la enfermedad al trasplante, ya sea remisión completa (RC), remisión parcial (RP), enfermedad estable o progresada (EE/EP), líneas de quimioterapia previas al trasplante (se consideró como severamente pre-tratados el haber recibido  $\geq 3$  líneas). Del mismo modo se tomaron en cuenta las comorbilidades pre-existentes evaluadas de acuerdo al índice HCT-CI (Sorrow, Blood 2005) (riesgo bajo: 0, intermedio: 1 o 2, y alto:  $\geq 3$ ), los esquemas de acondicionamiento (melfalán; CBV: carmustina, ciclofosfamida, etopósido; BEAM: carmustina, etopósido, citarabina, melfalán; BendaEAM: bendamustina, etopósido, citarabina, melfalán; busulfán-ciclofosfamida y otras combinatorias menos frecuentes). Finalmente se tabuló la celularidad de la infusión de células progenitoras hematopoyéticas (definido como baja celularidad:  $CD34+ < 3 \times 10^6/kg$ ).

Se consideró como morbilidad post-trasplante a la necesidad de intubación orotraqueal/asistencia respiratoria mecánica (IOT/ARM), el requerimiento de vasopresores y de diálisis ocurrido dentro de los 100 días de la infusión. La mortalidad se definió como temprana cuando el evento ocurrió previo al día 100 y, tardía, a *posteriori*. El evento combinado de morbi-mortalidad temprana incluyó a cualquiera de



los eventos de morbilidad y/o de mortalidad temprana. Los parámetros evaluados fueron MLE tanto temprana como tardía, recaída y SG. Las características principales de la población se describen en el capítulo de resultados correspondiente.

#### 1.1.2. Desarrollo del sistema multifactorial de predicción de MLE

Se homogeneizó la base de datos anteriormente descrita incluyendo únicamente aquellos pacientes adultos trasplantados cuya enfermedad de base fuera mieloma múltiple o linfoma. Se amplió la serie a 2068 trasplantes realizados en el período comprendido entre enero/2000 y abril/2017, con un mínimo de seguimiento de 100 días (media de seguimiento de 1,9 años). A los centros antes mencionados se agregaron CEMIC, CETRAMOR, Sanatorio Británico de Rosario y Sanatorio Allende.

Los datos recolectados fueron los mismos a los descriptos en el ítem anterior. Se analizaron los mismos eventos de morbilidad temprana, MLE y SG.

### 1.2. Trasplante alogénico de CPH

#### 1.2.1. Impacto de las variables clínicas en el trasplante alogénico

La evaluación de los factores de riesgo clínicos asociados a la evolución del trasplante alogénico fue realizada a partir de la base de datos de la Unidad de Trasplante Hematopoyético del Hospital Universitario Austral.

Se incluyeron pacientes tanto adultos como pediátricos que recibieron un trasplante alogénico desde la apertura de la unidad en enero/2002 hasta diciembre/2016, excluyendo los trasplantes haploidénticos. La media de seguimiento fue de 2,4 años. Las características clínicas principales que incluyó el análisis fueron edad, sexo, HCT-CI, enfermedad de base (LMA, LLA, SMD, AAS, síndromes linfoproliferativos [SLP], neoplasias mieloproliferativas crónicas [NMP]; otras patologías malignas incluyendo fundamentalmente discrasia de células plasmáticas; patologías benignas), *status* pre trasplante (RC, RP, EE/EP); características de los donantes (edad, sexo y gestas), parentesco entre ambos (relacionado o NR), compatibilidad HLA, *status* de CMV (serología pre trasplante), el régimen de acondicionamiento utilizado (mieloablativo o RIC), fuente de CPH (médula ósea, MO; sangre periférica, CMSP; cordón umbilical, UCU), el régimen de inmunosupresión (basado en ciclosporina, tacrolimus, uso de ATG, u otras combinaciones menos frecuentes).

Los eventos evaluados fueron: rechazo, EICH aguda y crónica, fallecimiento, causa de fallecimiento y recaída, con las respectivas fechas de ocurrencia. Las

características principales de la población se describen en el capítulo de resultados correspondiente.

### 1.2.2. Trasplante alogénico en pacientes mayores

A partir de una propuesta de trabajo realizada por la Unidad de Trasplante Hematopoyético del Hospital Universitario Austral, se analizaron de manera retrospectiva 137 pacientes mayores de 50 años que recibieron un trasplante alogénico en centros de trasplante pertenecientes al GATMO desde enero/1997 y julio/2013. La media de seguimiento fue de 1,3 años, con un mínimo de 100 días.

Los centros participantes fueron: Hospital Universitario Austral, Instituto Alexander Fleming, Hospital Italiano de Buenos Aires, Hospital Italiano La Plata, FUNDALEU, Hospital Alemán, Hospital Privado de Córdoba, Fundación Favaloro, Sanatorio Allende. Los datos clínicos solicitados fueron similares a los descriptos en el apartado 1.2. Las características principales de la población se describen en el capítulo de resultados correspondiente.

## **2. Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos fueron realizado con el programa SPSS (actualmente llamado IBM SPSS *statistics*) en sus diferentes versiones 11.0.4 a 23, según el momento (SPSS Inc, IL, EE.UU.), R o easyR (<http://r-project.org>).

### **2.1. Análisis univariados**

Las probabilidades de SG y SLE fueron comparadas utilizando el método de log-rank (Mantel-Cox) y estimadas mediante el límite del producto según Kaplan-Meier (Kaplan, JSTOR 1958). Para Recaída, MLE y EICHc se utilizó el test de Gray con análisis de incidencia acumulada (Gray, Ann Stat 1988). El evento competitivo de recaída fue muerte sin recaída, el de MLE fue la recaída; para EICHc fue muerte o recaída sin EICHc.

Para el análisis de EICHa, *engraftment*, probabilidad de muerte por una causa determinada, eventos tempranos de morbilidad post trasplante autólogo (definidos como requerimiento de asistencia respiratoria mecánica, vasopresores o diálisis dentro del día 100 post trasplante), y para los casos en los que no se obtuvo la fecha de desarrollo de EICHc, se utilizó la prueba  $\chi^2$  (tres grupos o más) o exacta de Fisher (variable dicotómica) evaluado a dos colas.

La variable edad fue analizada como categórica utilizando diferentes puntos de corte según el tipo de trasplante. En el caso de los trasplantes autólogos (incluyó solo adultos), se evaluaron puntos de corte cada 10 años (15-24, 25-34, 35-44, 45-54, 55-64 y  $\geq 65$ ) para definir el punto de corte de mejor predicción de MLE. En el caso de los trasplantes alogénicos (incluyó pediátricos y adultos) cuatro grupos etarios (0-15, 16-29, 30-49 y  $\geq 50$  años). El último corte de edad (50 años), teniendo en cuenta diversas series previamente publicadas (ver introducción, 1.8.2), se utilizó para definir pacientes mayores. A su vez dentro de este grupo, se dividió a los pacientes entre 50-60 y  $\geq 60$  años. En el caso de los trasplantes alogénicos NR el valor de corte utilizado fue 40 años. Por último, la edad de los donantes fue dicotomizada en 30 años según los estándares de evaluación (ver introducción 1.8.4).

El valor de la p menor a 0,05 fue considerado como significativo; mientras que, entre 0,05 y 0,1 fue considerado como una tendencia estadística.

## **2.2. Análisis Multivariados**

Se utilizó el modelo de regresión según Cox (Cox, J. R. Statist. Soc, 1972) para los factores tiempo dependiente (SG, SLE, recaída, MLE y EICH crónica) evaluados desde la fecha del procedimiento hasta el evento correspondiente.

El método de regresión de Fine-Gray (Fine, J. Am. Stat. Assoc. 1997) se empleó para los eventos tiempo dependiente con evento competitivo (Recaída, MLE). Este método fue utilizado primordialmente para el análisis de poblaciones grandes (superiores a 1000 individuos) incluyendo el estudio de HCT-CI y el desarrollo del *score* multifactorial de predicción de mortalidad libre de enfermedad en el TCPH autólogo.

Para los análisis multivariados de los eventos dicotómicos, como el evento combinado de morbi-mortalidad temprana, la necesidad de IOT-ARM, diálisis o vasopresores; EICHa se utilizó regresión logística (Walker, Biometrika 1967).

En los análisis multivariados se incluyeron todos los factores que en los análisis univariados reflejaron valores de p menores o iguales a 0,2. Los resultados fueron expresados en *Odds ratio* (OR) o *Hazard Ratio* (HR) con sus respectivos intervalos de Confianza (IC) 95%, según corresponde.

## **CAPITULO 2. EVALUACIÓN DEL ROL DE TGF- $\beta$ 1 EN EL TCPH ALOGÉNICO**

### **1. Impacto de los polimorfismos funcionales del gen *TGFBI***

#### **1.1. Poblaciones**

##### **1.1.1. Trasplante alogénico relacionado**

Se analizó de manera retrospectiva una cohorte de 245 pacientes adultos y pediátricos sometidos a un trasplante alogénico relacionado. Este estudio, realizado a partir de una propuesta de la Unidad de Trasplante Hematopoyético del Hospital Universitario Austral, incluyó a los centros de trasplante que realizaban la tipificación del HLA en un mismo centro (Primer Centro Argentino de Inmunogenética, PRICAI). Se obtuvieron los datos de los trasplantes realizados entre enero/2000 y diciembre/2014. Los centros participantes fueron el Hospital Universitario Austral, la Fundación Favaloro, Fundaleu, Instituto Alexander Fleming. La media de seguimiento de 4,4 años.

Se obtuvieron alícuotas de las muestras de ácido desoxirribonucleico (ADN) utilizadas para la tipificación del HLA de los pacientes y sus respectivos donantes, almacenadas en el PRICAI. El estudio contó con la aprobación por parte del comité de institucional de evaluación de la Facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral (resolución 13-018, proyecto: Impacto del polimorfismo de *TGFBI* en trasplante de precursores hematopoyéticos alogénico relacionados). Las muestras fueron rotuladas de acuerdo al código interno del estudio y conservadas a -20°C.

Los datos clínicos obtenidos fueron similares a los descriptos en métodos 1.2 del capítulo 1. En cuanto a las estrategias de acondicionamiento utilizadas, se registró si estaban basadas en ciclofosfamida acompañada de busulfán o de irradiación corporal total en las mieloablativas, y si fueron a base de fludarabina en el caso de los RIC. Los esquemas de inmunosupresión fueron consignados como tacrolimus-metotrexate, ciclosporina-metotrexate u otros (incluyendo miclofenolato y otras combinaciones menos frecuentes). Las características principales de la población se describen en el capítulo de resultados correspondiente.

##### **1.1.2. Trasplante Alogénico No Relacionado**

Se analizó una serie de 686 pacientes sometidos a un trasplante alogénico NR pertenecientes a la base de datos general del Anthony Nolan Trust (ANT), Londres, Reino Unido. Esta base de datos corresponde a una cohorte prospectiva de pacientes adultos y pediátricos que recibieron un trasplante alogénico NR realizado en unidades

de trasplantes hematopoyético del Reino Unido a partir de donantes tipificados en el Anthony Nolan Trust. Los trasplantes fueron llevados a cabo entre 1997 y 2006, con una media de seguimiento de 4,8 años.

Las muestras fueron obtenidas pre-trasplante luego de la firma del consentimiento informado correspondiente. El estudio fue aprobado por el comité de ética institucional. Se tomaron 50mL de sangre, de los cuales 40mL se diluyeron en un volumen equivalente de medio de transporte (168mL de  $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$  3,3% p/v, 700mL en el medio *Roswell Park Memorial* [RPMI]-1640 suplementado con glutamina [BioWittaker, EE.UU..]) y 7mL de beta mercapto-etanol 5 $\mu$ M. Los restantes 10mL de sangre se colocaron en un tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (1,6mg/mL). Ambas alícuotas fueron conservadas a -20°C.

Los datos consignados de los pacientes fueron: edad, sexo, enfermedad (LMA, LLA, LMC, SMD, SLP, otras enfermedades que incluyen patologías malignas como MM, mielofibrosis y no malignas como AAS, hemoglobinopatías, inmunodeficiencia y fallos medulares congénitos), *status* pre trasplante (temprano y tardío), de los donantes (edad, sexo y gestas), compatibilidad HLA entre donante y receptor (10/10, incluyendo HLA -A, -B, -C, -DR y -DQ o 12/12 si se agrega -DP), el régimen de acondicionamiento utilizado (mieloablativo o RIC), el régimen de inmunosupresión (ciclosporina, ciclosporina más metotrexate u otro), la depleción de células T (en esta cohorte se utilizó mayoritariamente alentuzumab, salvo excepciones), la fuente de CPH (médula ósea o sangre periférica) y el registro de la evolución post trasplante (rechazo, EICH aguda y crónica, fallecimiento, causa de fallecimiento y recaída) con la respectivas fechas de ocurrencia. Las características principales de la población se describen en el capítulo de resultados correspondiente.

## **1.2. Extracción de ADN**

### **1.2.1. Técnica de “salting out”**

Se mezcló sangre entera con *buffer* de lisis de glóbulos rojos (Tris-HCL 10mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, NaCl 10mM) en una proporción 1:1 v/v (volumen final 15mL), invirtiendo los tubos para asegurar una mezcla homogénea. Luego de una incubación a temperatura ambiente (TA) por 10 min., se realizó una centrifugación a 3500 revoluciones por minuto (RPM) por 10 min, seguido de descarte del sobrenadante y re-suspensión del botón. Se repitió este proceso hasta obtener un sobrenadante claro.

Se descartó el sobrenadante, se añadió 240µL de agua estéril y 80µL de *buffer* de quinasas de proteínas (Tris 10mM pH=7,5, EDTA 10mM pH=8,0 y NaCl 50mM), agitando los tubos manualmente hasta romper el botón, y se agregó 30µL de proteinasa K (pK) 10mg/mL (Sigma-Aldrich, EE.UU..) y 20µL de dodecil sulfato de sodio (SDS) 10% (Invitrogen, Reino Unido), seguido de una incubación durante la noche a 37°C.

Se agregó 100µL de NaCl 5M, disgregando vigorosamente por 15 seg., seguido de una centrifugación a 13000 RPM por 5 min. Se agregó 1mL etanol 100% frío y se invirtió manualmente hasta que el ADN fuera visible. En caso de no visualización, se refrigeró a -20°C durante la noche, seguido de una centrifugación a 13000 RPM por 20 min., se descartó el sobrenadante, se lavó con etanol 70% y se dejó secar la muestra. Se re suspendió en volumen variable (50/100µL) de agua estéril obteniéndose una concentración de 0,1-2,0 µg/µL (Miller, Nucleic Acids Res 1988).

#### 1.2.2. Muestras provenientes de cepillado de mucosa oral

Para este proceso se utilizó un *kit* comercial y se prosiguió de acuerdo al protocolo adjunto según las normas del fabricante (Gentra Puregene, Qiagen) en el que se recolectan las muestras de la mucosa oral con un cepillo provisto. Luego de secado a TA por 2 hs. se agregó la solución de lisis celular y 3µL pK 10mg/mL (Sigma-Aldrich), se mezcló invirtiendo los tubos 25 veces y se incubó a 55°C por 12 hs.

Se realizó un centrifugado a 13000 RPM por 1 min., seguido de una incubación con 3µL de solución desnaturante del ácido ribonucleico (ARN) 4mg/mL (Gentra Qiagen Inc., CA, EE.UU..) a 37°C por 45-60 min. Tras enfriar a 4°C, se agregó 250µL de solución de precipitación de proteínas (Gentra Qiagen Inc) y se disgregó vigorosamente. Luego de una incubación a 4°C por 20 min. se centrifugó 13000 RPM por 5 min., al sobrenadante se le agregaron 400µL de isopropanol 100% y 2µL glucógeno, y se incubó a TA por 15 min.

Luego de centrifugar a 13000 RPM por 5 min., se descartó el sobrenadante y se drenó el tubo en papel absorbente limpio, se agregó 300µL de etanol 70% v/v y se invirtió el tubo. Se procedió con una centrifugación a 13000 RPM por un min., se secó al aire por 30-60 min. y se rehidrató con 50µL de agua destilada estéril.

#### 1.2.3. Análisis cuantitativo y cualitativo. Determinación de concentración y pureza

La calidad del ADN se midió con un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, Delaware, EE.UU..). Este método se basa en la utilización de luz ultravioleta (entre 260

y 280nm). La concentración de ADN se estimó en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  considerando que coeficiente de absorbancia para ADN doble cadena a 260nm es 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por cada unidad de densidad óptica (DO). La concentración óptima se estableció entre 100-200  $\text{ng}/\mu\text{L}$  y la calidad adecuada con una relación  $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$  entre 1,6-1,8.

### 1.3. Reacción de PCR alelo específica

Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *polimerase chain reaction*) alelo específica para analizar los polimorfismos de nucleótido único (SNP, por sus siglas en inglés: *single nucleotide polymorphism*) del exón 1 del gen *TGFBI* +29 (codificante[c].29C>T, proteína[p].P10L, rs1800470) y +74 (c.74G>C, p.A25P, rs1800471) en muestras de pacientes y donantes de trasplante alogénico.

#### 1.3.1. Elección de los *primers*

Se seleccionaron los *primers* de acuerdo a Perrey y col. (Perrey, Transpl Immunol 1999). Como control interno de amplificación se utilizó el gen de la hormona de crecimiento humana (*HGF*). Previamente a su utilización se confirmó que cumplieran con las condiciones necesarias: longitud aproximada de 20 pares de bases (pb), una proporción C-G 60% y baja dimerización.

Los *primers* fueron (en negrita se resalta la base específica según el SNP):

#### -*TGFBI*

- +29 anti sentido T: 5'-AGCAGCGGTAGCAGCAGCAA-3'
- +29 anti sentido C: 5'-GCAGCGGTAGCAGCAGCC-3'
- +29 sentido común: 5'-TCCGTGGGATACTGAGACAC-3'
- +74, sentido G: 5'-GTGCTGACGCCTGGCCG-3'
- +74 sentido C: 5'-GTGCTGACGCCTGGCCC-3'
- +74 anti sentido común: 5'-GGCTCCGGTTCTGCACTC-3'

#### -*HGF*

- I 5'- GCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3'
- II 5'- TCACGGATTTCTGTTGTGTTTC-3'

#### 1.3.2. Diseño de la reacción de PCR alelo específica

Esta reacción se realizó utilizando reactivos provistos por Bioline (Bioline Ltd., Reino Unido). En primer lugar para establecer la temperatura de *melting* ( $T_m$ ) óptima

para cada par de *primers* se comenzó con una reacción de PCR básica ya conocida (exón 8 NOD2/CARD15) (Mayor N, J Clin Oncol 2007), programando el ciclado con 12 Tm diferentes (rango de 57-70°C). Luego se tituló el MgCl<sub>2</sub> probando diferentes concentraciones entre 0,25µL-0,45µL. Se ajustaron los restantes reactivos de acuerdo a los resultados obtenidos. Posteriormente, se agregó el par de *primers* control de la reacción, se establecieron las condiciones de la PCR en multiplex re-evaluando la Tm y la concentración óptima de MgCl<sub>2</sub>.

### 1.3.3. Reacción final de PCR

	+29 T	+29 C	+74 G	+74 C
Buffer (10x, Bioline)	1,25µL			
Primer específico	0,5µM			
Primer común	0,5µM			
MgCl <sub>2</sub>	1,5mM	1,4mM	1,4mM	1,4mM
dNTPs	0,2µM			
Primer HGF 5´	0,4µM	0,5µM	0,5µM	0,5µM
Primer HGF 3´	0,4µM	0,5µM	0,5µM	0,5µM
Taq Polimerasa (Bioline)	0,5U			
H <sub>2</sub> O	9,15µL	9,1µL	9,1µL	9,1µL
ADN	50ng			
Desnaturalización inicial	95°C (2 min.)			
Ciclado (37 ciclos)	95°C (30 seg.)			
	65,5°C (40 seg.)	63,6°C (40 seg.)	65,5°C (40 seg.)	61,1°C (40 seg.)
Extensión final	72°C por 30 seg.			

La PCR alelo específica para los SNP +29 y +74 del gen de *TGFBI* de los pacientes y sus respectivos donantes que recibieron un trasplante alogénico relacionado se realizó con algunas variaciones menores a la descrita previamente: volumen final de 25µL, 200ng de ADN genómico, KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, Tris/HCl 10mM pH 8,3, *primers* +29 T y C y +74 C 0,6µM, *primer* +74 G 1,2 µM, el control interno fue Beta globina (*HBB*) (*primer* I: 5'-TACAATGTATCATGCCTCTTTGCACC-3', *primer* II 5'-TATTTTCCCAAGGTTTGAAGTAGCT-3'). El resto de los componentes fue en concentraciones similares a la reacción previamente descrita, al igual que el tamaño del producto amplificado. El ciclado fue uniforme para las cuatro reacciones e incluyó 10 ciclos de 95°C por 30 seg., 65°C por 50 seg., 72°C por 45 seg. seguido de 25 ciclos de 95°C por 30 seg., 59°C por 50 seg. y 72°C por 45 seg., finalizando con una extensión de 72°C por 3 min.



#### 1.3.4. Lectura del producto final

El producto final de 240 pb de la reacción de PCR SSP +29, 233 pb del +74 y 424 pb del control interno fue leído en un gel de agarosa 1,5% p/v. Para la preparación del gel de agarosa, a 100mL de 1xTBE *buffer* (Accugene, Lonza, Maine, EE.UU..) se agregó 1,5g de agarosa (Invitrogen Ltd., Reino Unido), se calentó por 2 min. y, luego de enfriar, se adicionaron 5µL bromuro de etidio (EtBr) 500ng/mL.

Tras volcar en un recipiente, se colocaron los peines de los *wells*. Luego de 1 hora a TA, se llenó la cuba con 1xTBE *buffer* y se retiraron los moldes. Para el control del tamaño del producto de PCR durante la corrida de electroforesis, se sembró el *ladder* (*easy ladder* para productos entre 300 y 1000 pb), y se mezcló el producto de PCR (12µL/2µL) con el *buffer* TBE 0,5X (TBE 1X: Tris/HCl 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8,0). Cada corrida incluyó una muestra sin ADN (control blanco de amplificación), una muestra positiva (portador del alelo correspondiente) y una negativa (no portador del alelo buscado). Una vez finalizada la electroforesis (140 voltios por 30 min), se observó la presencia de los productos de amplificación en un transiluminador UV (figura 9).

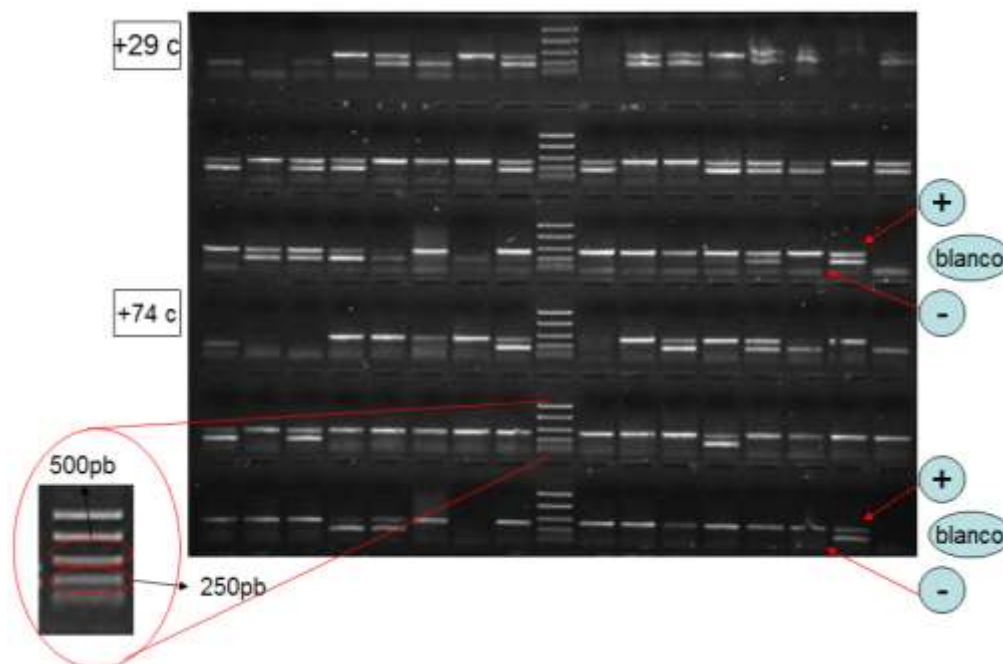


Figura 9. Patrones obtenidos de los productos de amplificación por PCR SSP para los SNP +29 C y +74 C. Las primeras tres filas corresponden a 45 muestras incógnitas analizadas para el SNP +29 C y las 3 últimas, a 45 muestras analizadas para el SNP +74 C. El producto control corresponde a la hormona de crecimiento HGF (500 pb). En las últimas calles de cada reacción se indican los controles correspondientes. Blanco: control blanco, +: control positivo, -: control negativo, *ladder*: marcador de peso molecular. Electroforesis en gel de agarosa 1,5 % p/v.

### 1.3.5. Confirmación de los resultados mediante secuenciación

Para validar los resultados de las reacciones de las PCR SSP se secuenciaron 25 muestras que confirmaron los resultados previamente obtenidos.

Con la finalidad de analizar la región genómica de interés, se diseñaron nuevos *primers* agregando secuencias adicionales del fago M13 sentido y anti sentido (secuencias resaltadas en negrita y subrayadas). El producto de amplificación final fue de 644 pb (figura 10).

- sentido 5'-**GTAAAACGACGGCCAGTTCCGTGGGATACTGAGACAC-3'**
- anti sentido 5'-**CAGGAAACAGCTATGACCCAGTTTCTTCTGCCAGTCA-3'**

El ajuste de las condiciones óptimas de amplificación se realizó de manera similar al ítem 3.2 anteriormente detallado. Reacción en volumen final de 25µL: 2,5µL 10x buffer, *primer* sentido 0,5µM, *primer* anti sentido 0,5µM, 0,5µL MgCl<sub>2</sub> 5µM, 0,4µL dNTPs (12,5µM cada uno), Taq polimerasa (Bioline Ltd., Reino Unido) 0,1U, agua estéril 19,4µL, 100ng ADN. Condiciones del ciclado: 95°C por 2 min., seguido de 37 ciclos de 95°C por 30 seg. y 59,5°C por 40 seg., seguido de 72°C por 30 seg. y 4°C por 5 min. El producto obtenido luego de la amplificación fue confirmado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% p/v con posterior visualización con EtBr en un transiluminador UV.

```

541  goctgtctcc tgagcccccg cgcattcctag accctttctc ctccaggaga cggatctctc
601  tccgacctgc cacagatccc ctattcaaga ccaccacct tctggtacca gatcgcgccc
661  atctaggtta tttccgtggg atactgagac acccccggtc caagcctccc ctccaccact
721  ggcgccctct ccctgaggac ctcagctttc cctcgaggcc ctctacctt ttgccgggag
781  acccccagcc cctgcagggg cggggcctcc ccaccacacc agcctgttc gcgctctcgg
841  cagtgcgggg gggcgccgcc tccccatgc cgccctcgg gctgcggctg ctgcXgctgc
901  tgctaccgct gctgtggcta ctggtgctga cgctggccg gccggccgg ggactatcca
961  cctgcaagac tatcgacatg gagctggtga agcggagcX catcgaggcc atccgcgcc
1021 agatcctgtc caagetgagg ctcgccaacc ccccagcca gggggagggt ccgcccgcc
1081 cgctgcccga ggccgtgctc gccctgtaca acagcaccg cgaccgggtg gccggggaga
1141 gtgcagaacc ggagcccag cctgaggccg actactacg caaggaggtc acccgctgc
1201 taatggtgga aaccacaac ggtgagctcg gaggggcagg ggagccggga ggggggccc
1261 cagggggcgc cggagtgccg gggccacggg taggaagga ctggcagag aaactggctg
1321 gaggaagagg acaccggg gcaaaggaa cgtgtgatgg tgggagggg gtgtccgaaa

```

Figura 10. Región de interés del gen *TGFBI* (Homo Sapiens *TGFBI* RefSeqGene, cromosoma 19, Referencia NG\_013364.1). En azul se muestra el *primer* sentido 5' (utilizado para la PCR SSP y la de secuenciación), en verde el *primer* anti sentido 5' de la PCR SSP y en amarillo el *primer* anti sentido 5' utilizado de la secuenciación. Resaltado con una X roja el SNP +29 y en azul del SNP +74.

La purificación del producto de amplificación se realizó utilizando un *kit* comercial (GFX *purification kit*, Reino Unido). Brevemente, se mezcló 200µL de *buffer* de captura con el contenido remanente de la reacción de PCR previa, se trasvasó a la columna provista seguido de una centrifugación a 16000 RPM por 30 seg., se agregó 200µL de *buffer* de lavado y nueva centrifugación 16000 RPM por 30 seg. Finalmente,

se agregó 50µL H<sub>2</sub>O estéril, se incubó 1 min. con posterior centrifugación a 16000 RPM por 1 min. y se descartó la columna.

La secuenciación se realizó utilizando terminadores de reacción según el método de Sanger, y las secuencias M13 sentido y anti sentido como cebadores. Esta reacción se realizó en hielo, volumen final de la reacción 10µL: reacción provista (Big Dye Terminator v3.1 *Cycle Sequence Kit*, Applied Biosystems, EE.UU.), 0,5µL 5x *buffer*, 1µL del *primer* correspondiente, 6,5µL H<sub>2</sub>O estéril, 1µL del templado purificado. Programa de amplificación: 25 ciclos de 96°C 10 seg., 50°C 5 seg., 60°C 4 min. El producto obtenido luego de la amplificación fue confirmado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% p/v, visualizado con EtBr en un transiluminador UV.

La extracción final del producto de amplificación se realizó cortando la región de interés del gel de agarosa utilizando EDTA 125 mM y una serie de centrifugados seguidos de inversión del producto en papel absorbente. Posteriormente, se agregó 200µL de agua destilada y fenol-cloroformo 1:1 v/v. Luego de 2 min. se centrifugó a 5000 RPM por 5 min. La capa superior de este contenido fue nuevamente mezclada con fenol-cloroformo y nuevamente centrifugada a 5000 RPM por 5 min. La capa superior se mezcló con 20µL de NaCl 5M, se disgregó vigorosamente y fue nuevamente centrifugada a 7000 RPM por 2 min. Al sobrenadante se le agregó 200µL de isopropanol, se invirtió nuevamente, seguido de un centrifugado a 10000 RPM por 5 min. Se descartó el sobrenadante, dejando invertido por 5 min. en papel secante y se dejó secar al aire por 30 min. Finalmente, se agregó 50µL de agua estéril. Luego se agregó 10µL de Formamida Hi-Di (AB Applied Biosystems, EE.UU..) y se procedió con la electroforesis capilar a fin de obtener la secuencia de interés (3730xl DNA Analyser, software Foundation data Collection versión 3.0 y el analizador de secuencias versión 5.2, AB Applied Biosystems, EE.UU..) (figura 11).

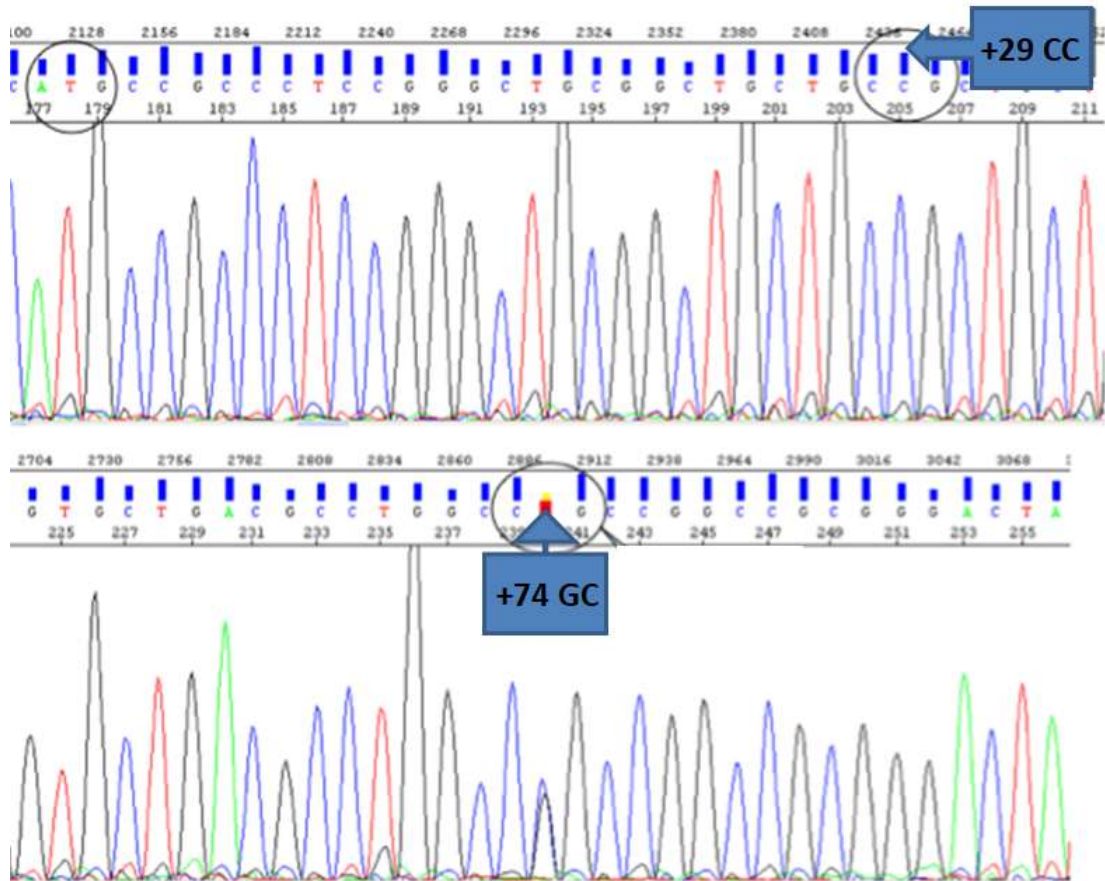


Figura 11. Electroferograma obtenido de la secuenciación automática. El primer círculo representa el codón de iniciación, el segundo el codón número 10 y el tercero el codón número 25. En este caso se ejemplifica un individuo homocigota para la posición +29 CC y heterocigota para la posición +74 GC.

#### **1.4. Análisis estadístico**

Los abordajes estadísticos utilizados para el análisis de los resultados obtenidos fueron similares a los descriptos para el capítulo 1 (2. Análisis estadístico)

El cálculo para determinar la diferencia de la prevalencia de los SNP entre los pacientes y/o donantes y los individuos sanos se realizó mediante la ley de Hardy-Weinberg:  $p^2 + 2pq + q^2 = (p + q)^2 = 1$ , donde p es la proporción de un determinado alelo y q es la proporción de alelo variante.

El cálculo del desequilibrio de ligamientos se realizó siguiendo las recomendaciones de Maynard (Maynard, Oxford U Press 1998) utilizando la fórmula  $D' = (p_{ab} \times p_{AB} - p_{aB} \times p_{Ab}) / (p_{ab} \times p_{AB} + p_{aB} \times p_{Ab})$ . El parámetro D' puede variar de -1 a 1 indicando máximo desequilibrio en los extremos; mientras que, D' = 0 indica un equilibrio perfecto.

## **2. ANALISIS FUNCIONALES DE TGF- $\beta$ 1 EN EL TCPH**

### **2.1. Obtención de células mononucleadas de sangre periférica**

#### 2.1.1. Técnica de *lymphoprep*

De la muestra de sangre diluidas 1:1 con medio de transporte, se tomaron 20mL a la cual se agregó 20mL de *lympholyte-H* (Cedarlane Lab. Ltd., Ontario Canadá). Luego de una centrifugación a 2200 RPM por 22 min. se transfirió la mono capa leucocitaria a un tubo con RPMI 1640 a 37°C. Se realizaron una serie de lavados/centrifugados con el mismo medio. La viabilidad se evaluó en cámara de Neubauer con azul de trypan al 10% p/v. (Sygma-Aldrich, MO, EE.UU..).

#### 2.1.2. Gradiente de Fycoll

Esta técnica separa las células utilizando centrifugación mediante gradiente de densidad. En un tubo de 50mL se mezcló 10mL de sangre venosa con 5mL de *ficoll Hypaque*, tras centrifugación a 2200 RPM por 20 min. se obtuvo la capa de mononucleares. Se realizó uno/dos lavados según la necesidad con NaCl 0,9% p/v.

### **2.2. Aislamiento de linfocitos T CD4+ y T reguladores**

Para este análisis se obtuvieron muestras de sangre periférica de 5 individuos sanos, previa toma de consentimiento informado. El aislamiento se realizó siguiendo el protocolo de *Mitlenyi Biotec* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania). Básicamente, se realizó una selección negativa de los linfocitos T CD4+, mediante una selección positiva de diferentes antígenos presentes en otras células del sistema hematopoyético (CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR $\gamma/\delta$  y CD235A) utilizando una columna magnética que fija las células que presentan estos antígenos. En el segundo paso se realizó una selección positiva de las células CD25+ que fueron fijadas en la columna magnética (figura 12).

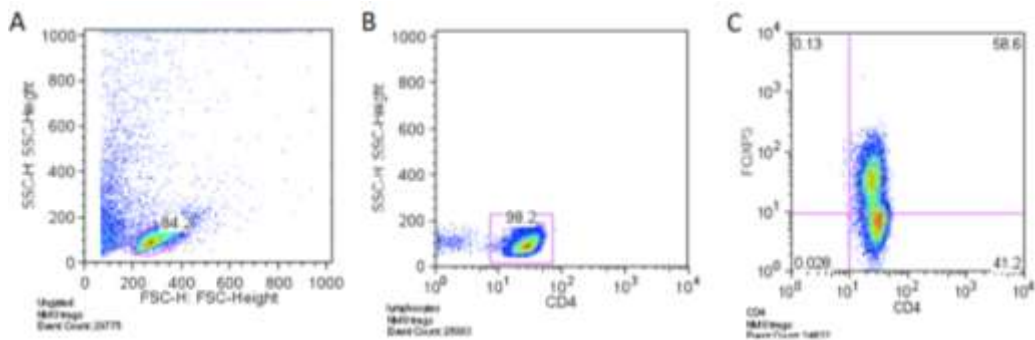


Figura 12. A: aislamiento de células mononucleadas de sangre periférica. B: tras el aislamiento por selección negativa de los CD4 se observa una pureza del 98%. C: tras selección positiva de las CD25 se observa una expresión de FOXP3 del 58%.

### 2.3. Análisis de activación *in vitro* de los linfocitos T reguladores

Luego de aislar los Tregs, fueron activadas en *well* con “fondo en u” (Sarstead, Inc. NC, EE.UU.). Se colocaron 50.000 células por *well*, agregándose 10mg de anti CD3 y 10mg de anti CD28 (BD Biosciences, CA, EE.UU.), 100UI de IL2, en medio de cultivo RPMI con 10% suero fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina. Los cultivos se realizaron en una incubadora a 37°C. Las lecturas correspondientes de los *wells* fueron hechas a las 0, 24, 48, 72 y 96 hs. con extracción de sobrenadante para medición de TGF- $\beta$ 1 (ver métodos capítulo 2, 2.7) y tinción-fijación de las células para análisis de citometría de flujo (método capítulo 2, 2.4).

### 2.4. Análisis por Citometría de Flujo

Se utilizaron los siguientes anticuerpos con las respectivas diluciones: CD4 PercP (1/25) (BD Bioscience), LAP PE (0,5/25) (R&D System Inc.), FOXP3 FitC (1.25/25) (BD Bioscience) e IFN-gamma APC (0,5/25) (BD Bioscience). Los controles fueron realizados con los siguientes isotipos: Iso PE (1/25) (BD Bioscience), Iso FitC (0,25/25) (BD Bioscience), Iso APC (0,5/25) (BD Bioscience). CD4, LAP e Iso PE fueron tinciones de superficie, mientras que FOXP3, IFN- $\gamma$ , Iso FitC e Iso APC fueron intracelulares. Los anticuerpos de superficie se diluyeron en *FACs buffer* (1x PBS, 2,5% suero fetal bovino) y los intracelulares en *buffer* de permeabilización 1x (BD Bioscience).

Brevemente, se centrifugaron las células (1800 RPM por 8 min.) y se procedió con un lavado con *FACs buffer* y un nuevo centrifugado a 1600 RPM por 7 min. a 4°C. Luego se le agregaron 50 $\mu$ L de la solución correspondiente de anticuerpos de superficie, seguido de 10 min. a 4°C y un nuevo lavado en *FACs buffer*. Las muestras fueron re-suspendidas en 100 $\mu$ L con la solución de fijación-permeabilización (BD Bioscience);

seguido de 30 min. a 4°C. Se realizó un nuevo lavado con *Buffer* de permeabilización y se adicionaron los anticuerpos intracelulares (50µL); 30 min. a 4°C. Para finalizar, se realizaron dos lavados con *buffer* de permeabilización y se re-suspendieron con 100µL de *FACs buffer*.

La lectura fue realizada en un citómetro FACS scalibur (BD, Oxford, RU). Se estableció una ventana de linfocitos mediante el tamaño celular y la granularidad. El proceso de tinción-fijación fue llevado a cabo en *wells* con “fondo v” (Nunc, Roskilde, Dinamarca).

## **2.5. Patrón de activación *in vivo* de los linfocitos T reguladores**

Con el objetivo de encontrar un patrón de activación de los Tregs en el período peri-trasplante, se obtuvieron muestras de sangre periférica de 29 pacientes adultos y pediátricos que recibieron un trasplante hematopoyético en el Hospital Universitario Austral de manera consecutiva desde abril/2010 a marzo/2013. En total se analizaron 8 pacientes que recibieron un trasplante autólogo, 11 trasplante alogénico relacionado y 10 no relacionado.

Se obtuvo la correspondiente aprobación por parte del comité de institucional de evaluación de la facultad de ciencias biomédicas de la Universidad Austral (resolución 11-002, proyecto Reconstitución inmune post trasplante hematopoyético y el impacto de polimorfismos del gen *TGFBI*) con previa toma de consentimiento informado.

Se extrajeron muestras de 10 mL. de sangre venosa heparinizada previo al trasplante y de haberse obtenido el prendimiento del injerto (*engraftment*) los días +14, +21, +28 y +70-100, según la disponibilidad.

Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo utilizando los siguientes marcadores: tinción de superficie según las guías de los fabricantes con CD4 FITC (BD Bioscience), LAP (TGF-β1) PerCP (R&D System Inc.), CD14 APC (BD Bioscience), intracitoplasmática FOXP3 PE (BD Bioscience); isotipos PerCP y PE. El proceso de tinción-fijación (ver métodos, 2.2.5) se realizó en tubos de 1ml. El citómetro utilizado fue el mismo que en métodos 2.2.5, al igual que la ventana de lectura. Estos análisis se llevaron a cabo en el Hospital de Clínicas “José de San Martín”, Universidad de Buenos Aires.



## **2.6. Impacto de los polimorfismos de *TGFB1* en la capacidad supresora *in vitro* de los linfocitos T reguladores**

Con el objetivo de analizar *in vitro* la capacidad de supresión de los Tregs, se obtuvieron muestras de sangre periférica (10 mL sangre venosa heparinizada) de 2 donantes sanos voluntarios por genotipo, previa firma del consentimiento informado.

Una vez obtenidas las células mononucleares de sangre periférica se aislaron las CD4 efectoras y los Tregs (CD4+/CD25+) (ver métodos 2.1 y 2.2). Las células CD4 efectoras fueron cultivadas en *wells* con “fondo en u” (Sarstead, Inc. NC, EE.UU.). Se colocaron 50.000 células por *well*, agregándose una estimulación policlonal con 10mg de anti CD3, 10mg de anti CD28 (BD Biosciences, CA, EE.UU.), 100UI de IL2, en medio de cultivo RPMI con 10% suero fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina. Los cultivos se realizaron en una incubadora a 37°C. A su vez estas células CD4 efectoras fueron cultivadas con y sin Tregs autólogos, a razón de 2:1.

Para evaluar la supresión celular por parte de los Tregs se utilizó el método de timidina. Brevemente consiste en la incorporación de 1µl (H<sup>3</sup>) timidina (Amersham) durante 16-18 hs. al cultivo antes mencionado tras 5 días. La proliferación celular fue cuantificada mediante la medición de la incorporación de timidina al ADN genómico de las células en división utilizando un contador Microbeta 1450 (Perkin Elmer Wallac). Los resultados fueron expresados en media de cuentas por minuto (cpm). La fórmula de supresión células fue la siguiente: % de supresión=1-(cpm efectores con Tregs/cpm efectores) x 100.

## **2.7. Medición de TGF-β1 en suero por técnica de luminex**

Se obtuvieron muestras de suero pre-trasplante de 434 pacientes y de 546 donantes, de los cuales, 385 conformaban pares donante/receptor, de la cohorte de trasplantes no relacionados del Anthony Nolan Trust tipificada para polimorfismos de gen *TGFB1* (según los métodos descriptos previamente capítulo 2, 1.1.2). Las muestras fueron conservadas a -70°C.

La medición se realizó mediante la técnica de luminex, siguiendo los pasos del fabricante (Panomics Inc., Fremont, CA, EE.UU.). Básicamente la técnica consiste en que la citoquina es reconocida por un anticuerpo específico de detección provisto por el fabricante (EPX01A-10249-901), marcado con estreptavidina-ficoeritrina, y este complejo, a su vez, se une al anticuerpo de captura que recubre *beads* magnéticas fluorescentes. El complejo sándwich formado es leído con un láser que capta la



fluorescencia emitida por la microesfera y mide la señal del fluorocromo proporcional a la cantidad de citoquina unida a la misma.

Brevemente, se descongelaron las muestras de suero, se tomó una alícuota de 150µL, seguido de una centrifugación a 1300 RPM por 7min., se pasó el sobrenadante a plato colector con filtro (poros 0.45µM) (Millpore Corporation, MA, EE.UU.) y nueva centrifugación a 1400 RPM por 5min. Se procedió con la acidificación-neutralización (en un plato de 96 *wells*) mezclando 40µL de cada muestra con 10µL de HCl, incubando por 10 min. a TA y agregando 8µL 1,2N NaOH/0,5M HEPES.

La corrida fue realizada según las normas del fabricante con una curva estandard más dos muestras negativas como control en cada plato. El producto se analizó en Liquichip200 (Qiagen) y fue leído con un software correspondiente (Luminex 100 IS Software, Luminex Corporation, Texas, EE.UU.).

## **2.8. Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos fueron realizado con el programa descriptos en los capítulos previos, agregándose Prismas versión 5.0 (GraphPad Software Inc, CA, EE.UU.).

Para la comparación de la media de los niveles plasmáticos, ya que la distribución de los valores fue no Gaussiana, se utilizaron test no paramétrico: Kruskal-Wallis (Kruskal, J Am Stat Assoc 1952) para la comparación de tres grupos y Mann-Whitney o prueba de suma de rangos de Wilcoxon (Wilcoxon, Biometrics 1945) para comparación de dos grupos.

Los abordajes empleados para el análisis de SG, SLE, MLE y recaída fueron descriptos previamente (métodos, capítulo 1, 2).

# **RESULTADOS y**

# **DISCUSION**

*En los siguientes capítulos de resultados, se describen diferentes análisis de cohortes de pacientes sometidos a trasplante autólogo y alogénico de CPH. Inicialmente se evalúa el impacto de variables clínicas en el trasplante autólogo y luego en el alogénico, con un enfoque especial en los pacientes mayores de 50 años. En el segundo capítulo se describe la relevancia de polimorfismos del gen TGFBI en el trasplante alogénico con donante relacionado y NR, y el abordaje experimental desarrollado con el objetivo de determinar la influencia de estos polimorfismos sobre la funcionalidad de TGF- $\beta$ 1.*

# **CAPÍTULO 1**

## **EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE LAS VARIABLES CLÍNICAS EN LA MORBIMORTALIDAD DEL TRASPLANTE DE CPH**

## **1. Impacto de las variables clínicas en el trasplante autólogo de CPH**

El objetivo de este apartado es el de identificar qué variables clínicas tuvieron una asociación con determinados resultados luego del trasplante autólogo. Se analizaron 1730 pacientes sometidos a trasplante autólogo de CPH realizados en 10 centros argentinos desde octubre/2002 hasta agosto/2016. Las características principales de la cohorte se describen en la tabla 5. La mediana de edad fue de 53 años con un predominio del sexo masculino. Alrededor del 50% presentaron mieloma múltiple como patología de base y un porcentaje similar se encontraban en remisión completa. El 13% de los pacientes fue considerado como severamente pre-tratados.

Tabla 5. Características de la cohorte (N: 1730)		N (%)
Edad Mediana: 53 años (rango: 15-74 años)	< 55 años	944 (55)
	≥ 55 años	786 (45)
Sexo	Masculino	1008 (58)
	Femenino	722 (42)
Enfermedad de base	Mieloma Múltiple	837 (48)
	Linfoma no Hodgkin	475 (27)
	Linfoma de Hodgkin	299 (17)
	Leucemia Mieloide Aguda	58 (3)
	Otros*	61 (4)
Tratamientos previos (líneas de quimioterapia)	1 línea	718 (46)
	2 líneas	629 (41)
	≥3 líneas	201 (13)
	Dato faltante	182
Status pre-trasplante	Remisión Completa	876 (51)
	Remisión Parcial	777 (46)
	Enfermedad Estable o Progresada	47 (3)
	Dato faltante	30
Acondicionamiento	Melfalán	833 (48)
	CBV	407 (24)
	BEAM	141 (8)
	BendaEAM	131 (8)
	BuCy	56 (3)
	Otros <sup>¶</sup>	161 (9)
Riesgo según HCT-CI	Bajo (0)	1032 (60)
	Intermedio (1-2)	502 (29)
	Alto (≥3)	196 (11)
Celularidad Infundida (número de CD34+)	<3x10 <sup>6</sup> /kg	450 (26)
	≥3x10 <sup>6</sup> /kg	1280 (74)

\*Otras patologías incluyen: tumores germinales, neuroblastoma, meduloblastoma, sarcoma de Ewing y osteosarcoma; CBV: carmustina, ciclofosfamida, etopósido; BEAM: carmustina, etopósido, citarabina, melfalán; BendaEAM bendamustina, etopósido, citarabina, melfalán; BuCy: busulfán, ciclofosfamida; ¶otros: incluye los esquemas de acondicionamiento remanentes; HCT-CI: *score* de comorbilidades pre-trasplante (ver introducción, 1.9.2); CD: *cluster* de diferenciación

Con una media de seguimiento de 1,2 años, la SG fue del 85% al año y del 75% a los 3 años. La MLE temprana, definida como previa al día 100, fue del 2,8%. Durante

este período, 5,4% requirieron intubación orotraqueal y asistencia respiratoria mecánica (IOT-ARM), 4,5% vasopresores y 2,1% diálisis. El análisis de morbi-mortalidad combinado (definido como cualquiera de los eventos anteriores) fue del 6,8%. La MLE a largo plazo fue del 4,0% a un año y del 5,0% a los 3 años.

### 1.1. Evaluación del HCT-CI en los eventos tempranos posteriores al trasplante

La presencia de comorbilidades fue evaluada de acuerdo a los criterios definidos según el *score* HCT-CI (descrito en la introducción, 1.8.2). Los pacientes con HCT-CI de riesgo alto (HCT-CI  $\geq 3$ ) tuvieron un incremento significativo de la MLE temprana comparado con los de riesgo intermedio y bajo (6,1% vs. 3,2% vs. 1,8% respectivamente,  $p=0,002$ , prueba de GrayGray). Asimismo, el aumento del riesgo según el *score* HCT-CI fue proporcional a la necesidad de IOT-ARM, de vasopresores, requerimiento de diálisis y el evento combinado de morbi-mortalidad (tabla 6).

**Tabla 6.** Morbi-mortalidad luego del trasplante autólogo en función del HCT-CI

	Riesgo según el HCT-CI			P (univ)
	Bajo	Intermedio	Alto	
Resultados (%)				
MLE día 100	1,8	3,2	6,1	0,002*
IOT-ARM	4,0	6,0	11,0	0,001¶
Vasopresores	3,0	5,8	8,7	0,001¶
Diálisis	1,6	2,4	4,1	0,065¶
Evento combinado M-M	4,7	9,0	13,0	<0,001¶

MLE: mortalidad libre de enfermedad; IOT-ARM: intubación orotraqueal-asistencia respiratoria mecánica; M-M: Morbi-Mortalidad; \* Prueba de Gray; ¶ Prueba de Chi<sup>2</sup>

### 1.2. Evaluación del HCT-CI en los eventos a largo plazo luego del trasplante

Los pacientes de riesgo alto presentaron un incremento significativo de la MLE a largo plazo comparado con los de riesgo intermedio y bajo (1 año 7,7% vs. 4,0% vs. 3,3%, y a los 3 años 10,8% vs. 4,0% vs. 4,8% respectivamente,  $p=0,002$ , prueba de Gray) (figura 13). Sin embargo, la SG fue similar para los tres grupos de riesgo (1 año riesgo alto 88% vs. intermedio 88% vs. bajo 89%, y 3 años 74% vs. 78% vs. 74%, respectivamente; prueba de log-rank  $p=0,985$ ) (figura 14).

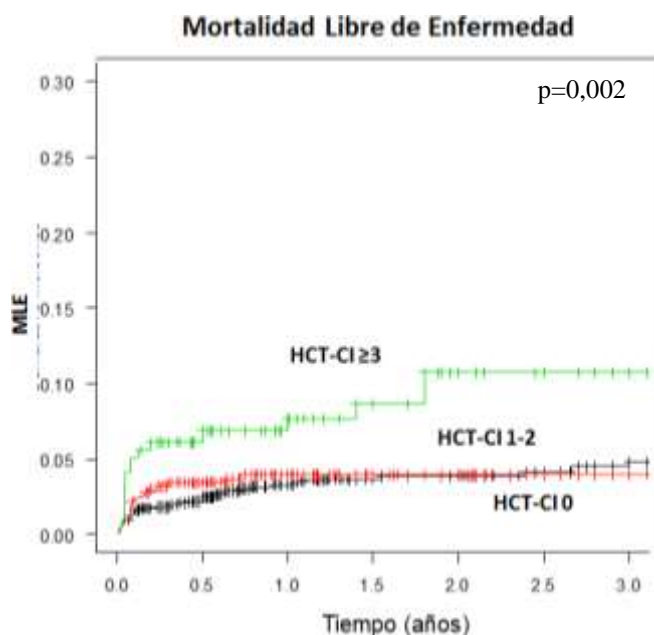


Figura 13. Curvas de incidencia acumulada evaluando la mortalidad libre de enfermedad (MLE) en función del HCT-CI. HCT-CI  $\geq 3$ : Riesgo alto (color verde), 1-2: intermedio (rojo), 0: bajo (negro)

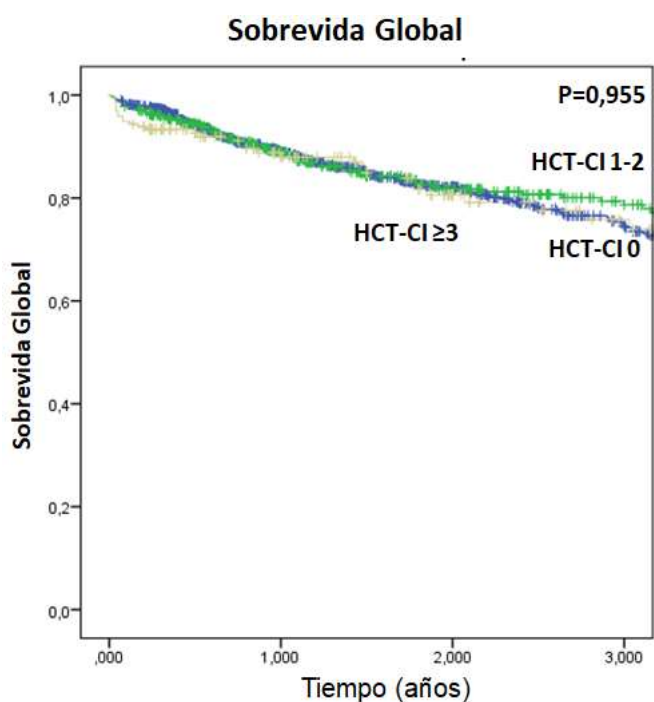


Figura 14. Curvas según Kaplan-Meier para supervivida global en función del *score* HCT-CI. HCT-CI  $\geq 3$ : riesgo alto (color marrón), 1-2: intermedio (verde), 0: bajo (azul).

### 1.3. Análisis multivariados

Luego del análisis multivariado aplicando regresión logística, el *score* HCT-CI demostró una asociación independiente para todos los eventos tempranos. El *Odds Ratio* (OR, intervalo de confianza del 95%) presentó un incremento proporcional al *score* para

el evento combinado de morbi-mortalidad (tabla 7), intubación orotraqueal-asistencia respiratoria mecánica (tabla 8), uso de vasopresores (tabla 9) y diálisis (tabla 10).

Tabla 7. Análisis multivariado para evento combinado morbi-mortalidad temprana

		<i>P</i>	<i>Odds Ratio</i>	IC 95%	
				Inferior	Superior
Edad	≥55 años	0,875	1,03	0,66	1,60
Enfermedad de Base	Linfoma no Hodgkin	0,001	2,17	1,38	3,40
Tratamientos previos	Severamente pre-tratados	0,065	1,64	0,96	2,80
Infusión CD34	≥3x10 <sup>6</sup> /kg	0,295	0,78	0,49	1,23
Régimen de Acondicionamiento	BendaEAM	0,001	2,71	1,52	4,83
Riesgo según HCT-CI	Bajo	ref.			
	Intermedio	0,002	2,16	1,32	3,53
	Alto	<0,001	3,35	1,90	5,92

CD: *cluster* de diferenciación; BendaEAM: bendamustina, etopósido, citarabina y melfalán; HCT-CI: *score* de comorbilidades pre-trasplante; IC intervalo de confianza; ref: referencia. Regresión logística

Tabla 8. Análisis multivariado de necesidad de intubación orotraqueal-asistencia respiratoria mecánica

		<i>P</i>	<i>Odds Ratio</i>	IC 95%	
				Inferior	Superior
Enfermedad de base	Linfoma no Hodgkin	<0,001	2,45	1,54	3,91
Tratamientos previos	Severamente pre-tratados	0,015	1,97	1,15	3,38
Régimen de Acondicionamiento	BendaEAM	0,010	2,49	1,36	4,55
Riesgo según HCT-CI	Bajo	ref.			
	Intermedio	0,025	1,84	1,10	3,10
	Alto	<0,001	3,07	1,71	5,51

BendaEAM: bendamustina, etopósido, citarabina y melfalán; HCT-CI: *score* de comorbilidades pre trasplante; IC intervalo de confianza; ref: referencia. Regresión logística

Tabla 9. Análisis multivariado de utilización de vasopresores

		<i>P</i>	<i>Odds Ratio</i>	IC 95%	
				Inferior	Superior
Enfermedad de base	Linfoma no Hodgkin	<0,001	2,60	1,56	4,34
Tratamientos previos	Severamente pre-tratados	0,055	1,78	0,98	3,22
Régimen de Acondicionamiento	BendaEAM	<0,001	3,25	1,75	6,06
Riesgo según HCT-CI	Bajo	ref.			
	Intermedio	0,003	2,32	1,32	4,07
	Alto	<0,001	3,41	1,79	6,48

BendaEAM: bendamustina, etopósido, citarabina y melfalán; HCT-CI: *score* de comorbilidades pre trasplante; IC: intervalo de confianza; ref.: referencia. Regresión logística

Tabla 10. Análisis multivariado de necesidad de diálisis

		<i>P</i>	<i>Odds Ratio</i>	IC 95%	
				Inferior	Superior
Edad	≥55 años	0,045	2,20	1,00	4,84
Tratamientos previos	Severamente pre-tratados	0,355	1,55	0,61	3,92
Régimen de Acondicionamiento	BendaEAM	0,065	2,60	0,94	7,13
Riesgo según HCT-CI	Bajo	ref.			
	Intermedio	0,155	1,86	0,78	4,40
	Alto	0,015	3,13	1,23	7,94

BendaEAM: bendamustina, etopósido, citarabina y melfalán; HCT-CI: *score* de comorbilidades pre trasplante; IC: intervalo de confianza; ref.: referencia. Regresión logística

Tras el análisis multivariado para la MLE los pacientes con un *score* de comorbilidades alto mostraron un riesgo 3 veces incrementado de mortalidad libre de enfermedad independiente de los restantes factores incluidos en el modelo (regresión de Fine-Gray) (tabla 11).

Tabla 11. Análisis multivariado de mortalidad libre de enfermedad

		<i>P</i>	<i>Hazard Ratio</i>	<i>IC 95%</i>	
				Inferior	Superior
Edad	≥ 55 años	0,015	2,47	1,13	3,01
Sexo	Masculino	0,045	2,02	1,01	2,87
<i>Status</i> pre-trasplante	Remisión completa	ref.			
	Remisión parcial	0,135	0,70	0,41	1,12
	Enf. estable/progresada	0,065	1,83	0,94	5,95
Tratamientos previos	Severamente pre-tratados	0,075	1,78	0,94	3,05
Enfermedad de base	Linfoma no Hodgkin	0,010	3,13	1,31	3,29
Régimen de acondicionamiento	BendaEAM	<0,001	3,76	1,70	5,44
Riesgo según HCT-CI	Bajo	ref.			
	Intermedio	0,333	0,97	0,75	2,31
	Alto	0,010	3,05	1,39	4,53

BendaEAM: combinación de bendamustina, etopósido, citarabina y melfalán; HCT-CI: *score* de comorbilidades pre trasplante; Enf.: enfermedad; IC: intervalo de confianza; ref.: referencia. Regresión de Fine Gray

#### 1.4. Análisis de variables clínicas independientes de las comorbilidades

Además de las comorbilidades otros factores influyeron de manera independiente en los eventos estudiados. El requerimiento de intubación orotraqueal-asistencia respiratoria mecánica fue mayor en los pacientes con LNH, en los pacientes severamente pre-tratados y con el régimen de acondicionamiento bendamustina-etopósido-citarabina-melfalán (BendaEAM) (tabla 8). La necesidad de vasopresores se vio incrementada en los pacientes con LNH, el uso de BendaEAM y una tendencia en aquellos severamente pre-tratados (tabla 9). La necesidad de diálisis fue mayor en los pacientes ≥ 55 años mientras que el uso de BendaEAM mostró sólo una tendencia (tabla 10).

El evento combinado de morbi-mortalidad estuvo asociado con el diagnóstico de LNH, al uso de BendaEAM y una tendencia con aquellos severamente pre-tratados (tabla 7). En cuanto a la MLE, los factores asociados con este evento fueron el sexo masculino, la edad (límite de 55 años), LNH como enfermedad de base y el uso de BendaEAM como régimen de acondicionamiento; mientras que aquellos severamente pre-tratados o con enfermedad estable/progresada mostraron sólo una tendencia (tabla 11).



## 1.5. Análisis del impacto del HCT-CI en subgrupos según patologías

Se realizó un sub-análisis evaluando el impacto del sistema de puntuación HCT-CI en las patologías predominantes: Mieloma Múltiple (N=837) y Linfoma (N=777).

### 1.5.1. Mieloma Múltiple

Los pacientes con Mieloma Múltiple presentaron una mediana de edad de 59 años, 55% sexo masculino, 41% se encontraban en remisión completa; 6% eran severamente pre-tratados y 54% tenían *score* HCT-CI de riesgo bajo. Este grupo de pacientes presentó una MLE temprana de 1,2% con un evento combinado de morbi-mortalidad temprana de 3,9%. La MLE a largo plazo (1 y 3 años) fue de 2,0% y 2,9%.

Al evaluar la evolución de los pacientes según el *score* HCT-CI, se observó un incremento significativo del evento combinado de morbi-mortalidad temprana para los pacientes riesgo intermedio/alto vs. bajo (5,4% vs. 2,7%,  $p=0,045$ , prueba exacta de Fisher). Sin embargo, esta categorización no se asoció con la MLE (1 año 2,1 % vs. 2,1% vs. 2,0%, y 3 años 5,5% vs. 2,1% vs. 2,7% respectivamente según el riesgo alto, intermedio y bajo,  $p=0,455$ , prueba de Gray) (figura 15 A) ni con la SG (1 año 95% vs. 93% vs. 95%, y 3 años 81% vs. 82% vs. 80%, respectivamente,  $p=0,855$ , prueba de log-rank) (figura 15 B).

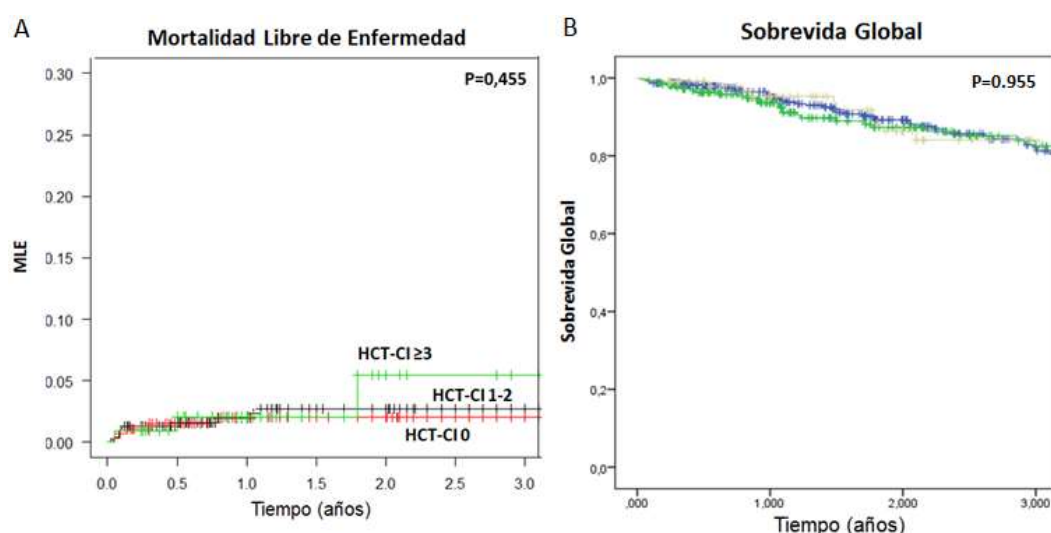


Figura 15.A: Curvas de incidencia acumulada evaluando la mortalidad libre de enfermedad (MLE) en función del HCT-CI en pacientes con Mieloma Múltiple. HCT-CI  $\geq 3$ : riesgo alto (color verde), 1-2: intermedio (negro), 0: bajo (rojo). B: Curvas según Kaplan-Meier para sobrevida global en función del HCT-CI en pacientes con Mieloma Múltiple. HCT-CI  $\geq 3$ : Riesgo alto (color marrón), 1-2: intermedio (color azul), 0: bajo (verde)

### 1.5.2. Linfomas

Los pacientes con diagnóstico de Linfoma tuvieron una mediana de edad de 45 años, 40% eran de sexo masculino, 20% fueron severamente pre-tratados, 61% se

encontraban en remisión completa y 65% eran riesgo bajo según el *score* HCT-CI. Este subgrupo de pacientes presentó una MLE temprana del 4,1% y 10,2% de evento combinado de morbi-mortalidad. La MLE a largo plazo (1 y 3 años) fue de 6,2 y 8,1%.

El descenso del riesgo según el *score* HCT-CI se asoció de manera significativa con una menor MLE temprana (12,7% vs. 6,1% vs. 4,5% según riesgo alto, intermedio y bajo, respectivamente,  $p < 0,001$ , prueba de Gray), así como con una menor tasa de evento combinado de morbi-mortalidad (24,0% vs. 13,5% vs. 6,6%,  $p < 0,001$ ,  $\chi^2$ ).

Del mismo modo, el riesgo alto según HCT-CI se asoció con un incremento de la MLE a largo plazo (1 año 15,1% vs. 6,9% vs. 4,5% y 3 años 18,1% vs. 6,9% vs. 8,1%, para riesgo alto, intermedio y bajo, respectivamente;  $p < 0,001$ , prueba de Gray) (figura 16 A) y con una reducción significativa de la SG (riesgo alto vs. intermedio/bajo 1 año 85% vs. 77% y 3 años 72% vs. 61% respectivamente,  $p = 0,035$ , prueba de log-rank) (figura 16 B).

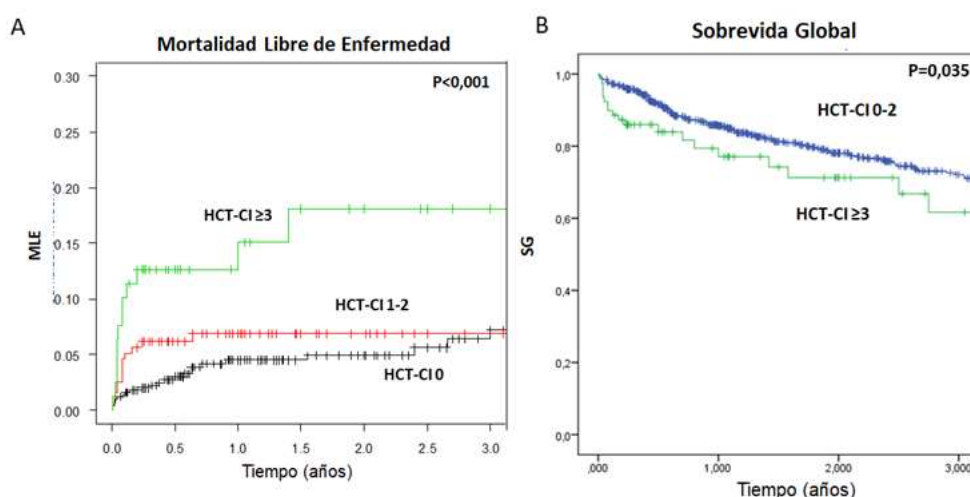


Figura 16. A: Curvas de incidencia acumulada evaluando la mortalidad libre de enfermedad (MLE) en función del HCT-CI en pacientes con Linfomas; HCT-CI 0: riesgo bajo (negro), 1-2: intermedio (rojo) y  $\geq 3$ : alto (verde). B: Curvas según Kaplan-Meier para sobrevida global en función del HCT-CI en pacientes con Linfoma; HCT-CI 0-2: riesgo bajo/intermedio (azul),  $\geq 3$ : alto (verde).

## 1.6. Sistema multifactorial de predicción de MLE

### 1.6.1. Construcción del modelo de predicción

Se desarrolló un sistema de puntuación propio y adecuado a los pacientes de los centros participantes con el objetivo de predecir la MLE frente a un trasplante autólogo de CPH en base a los resultados obtenidos en el análisis previo. Se combinaron las comorbilidades con otras variables clínicas y se desarrollaron los análisis que se describen a continuación. Para ello se amplió la serie y se seleccionó dentro de la casuística de centros del Grupo Argentino de Trasplante de Médula Ósea, una cohorte

más homogénea constituida por pacientes con MM y con linfomas (N: 2068 pacientes). Las características principales se encuentran descriptas en la tabla 12. La MLE temprana (día 100) fue del 3,1%, a largo plazo (1 y 3 años) 4,7 y 5,8% y la SG (1 y 5 años) 89 y 65%.

Tabla 12. Características de la cohorte (N 2068)		N (%)
Edad, media 50,8 años (rango 15-75 años)	<55 años	1067 (52)
	55-64 años	685 (33)
	≥65 años	316 (15)
Sexo	Masculino	1211 (59)
	Femenino	857 (41)
Enfermedad de base	Mieloma múltiple	1069 (52)
	Linfoma de Hodgkin	382 (18)
	Linfoma no Hodgkin	617 (30)
Líneas de quimioterapia pre-trasplante	1 línea	955 (46)
	2 líneas	838 (41)
	≥3 líneas	275 (13)
Status pre-trasplante	Remisión Completa	972 (53)
	Remisión Parcial	812 (44)
	Enfermedad estable/progresada	43 (3)
	Dato Faltante	241
Riesgo según HCT-CI	Bajo (0)	1207 (58)
	Intermedio (1-2)	605 (29)
	Alto (≥3)	256 (13)
Celularidad Infundida	<3x10 <sup>6</sup> /kg	539 (26)
	≥3x10 <sup>6</sup> /kg	1147 (63)
	Dato faltante	102

HCT-CI: *score* de comorbilidades; CD: *cluster* de diferenciación.

Inicialmente se realizó el análisis univariado para MLE de todos los factores incluidos en la tabla 12, exceptuando aquellos dependientes del centro como el régimen de acondicionamiento. Las variables que en el análisis univariado tuvieron una  $p < 0,2$  fueron incluidas en el análisis multivariado (regresión de Fine-Gray) según lo descrito en métodos (capítulo 1, 2.2) (figura 17). La edad fue inicialmente categorizada según los puntos de corte cada 10 años (ver métodos, capítulo 1, 2). La MLE fue similar en los cuatro grupos etarios menores a 55 años (15-24, 25-34, 35-44 y 45-54), con un incremento significativo entre los 55-64 años siendo más elevada en el de ≥65 años.

Las variables incluidas en el modelo inicial fueron: la edad (<55, 55-64 y ≥65 años), el sexo, el riesgo según el *score* HCT-CI (bajo, intermedio y alto), enfermedad de base (MM, LH y LNH), líneas de quimioterapia (severamente pre-tratado, definido como al menos 3 líneas vs. resto) y *status* pre-trasplante (RC vs. otros) (tabla 13).

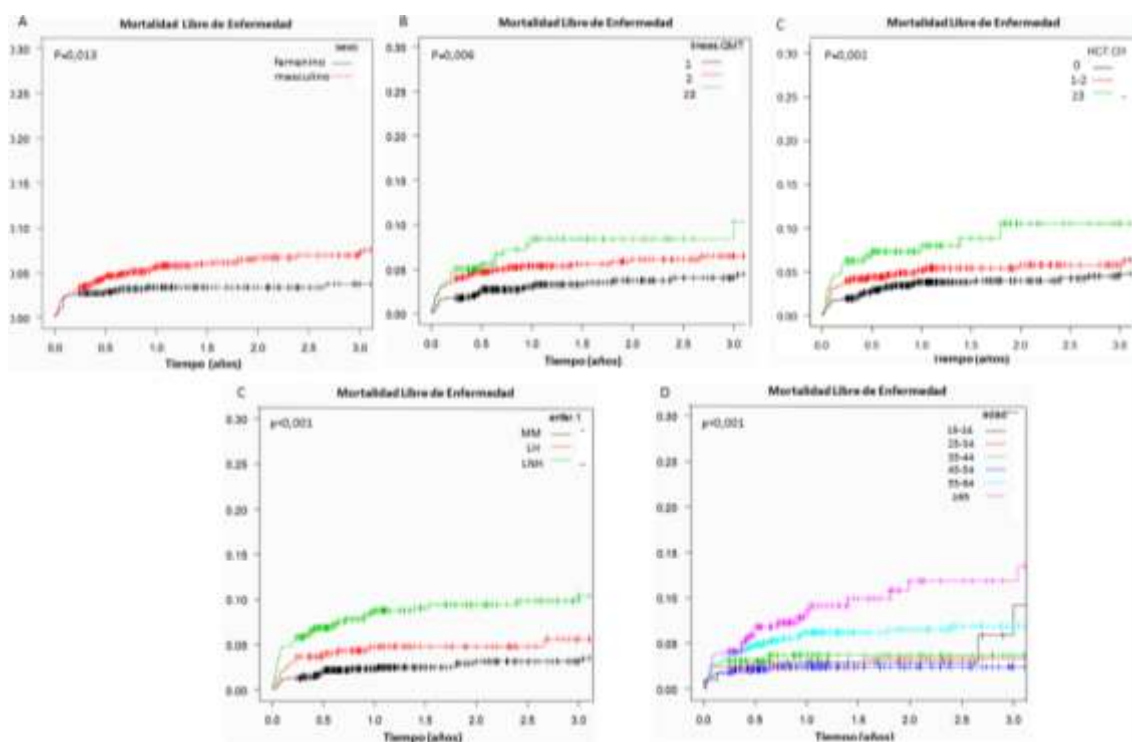


Figura 17. Curvas de incidencia acumulada evaluando la mortalidad libre de enfermedad (MLE) según sexo (A); líneas de quimioterapia pre-trasplante (B); *score* HCT-CI (C); patología de base (D); edad (E).

Tabla 13. Análisis multivariado de mortalidad libre de enfermedad

		<i>P</i>	<i>Hazard Ratio</i>	<i>IC 95%</i>	
				Inferior	Superior
Edad pacientes	<55 años	ref.			
	55-64 años	<0,001	2,57	1,55	4,28
	≥65 años	<0,001	4,47	2,60	7,69
Sexo	Masculino	0,010	1,70	1,70	2,62
<i>Status</i> pre trasplante	Remisión completa	ref.			
	Resto	0,965	0,90	0,58	1,60
Severamente pre-tratados		0,125	1,45	0,09	2,33
Enfermedad de base	Mieloma Múltiple	ref.			
	Linfoma de Hodgkin	<0,001	3,23	1,11	4,49
	Linfoma no Hodgkin	<0,001	3,58	2,32	5,54
Riesgo según HCT-CI	Bajo	ref.			
	Intermedio	0,090	1,46	0,93	2,30
	Alto	<0,001	2,28	1,35	3,84

HCT-CI: *score* de comorbilidades; IC, intervalo de confianza; ref: referencia. Regresión de Fine Gray

Posteriormente, los factores de riesgo que mostraron un impacto significativo independiente para la predicción de MLE fueron incluidos en el modelo final (regresión de Fine-Gray) (tabla 14). Las variables que no mostraron un incremento significativo fueron excluidas: *status* de la enfermedad, líneas de quimioterapia; o agrupadas: HCT-CI riesgo intermedio y bajo.

Tabla 14. Análisis multivariado de mortalidad libre de enfermedad (modelo final)

		P	Hazard Ratio	IC 95%	
				Inferior	Superior
Edad pacientes	<55 años	ref			
	55-64 años	<0,001	2,68	1,62	4,41
	≥65 años	<0,001	4,53	2,64	7,77
Sexo	Masculino	0,010	1,68	1,09	2,58
Patología de base	MM	ref			
	LH	<0,001	3,43	1,82	6,44
	LNH	<0,001	3,69	2,38	5,72
HCT-CI	Riesgo alto	0,006	1,96	1,21	3,17

MM: Mieloma múltiple, LH: linfoma de Hodgkin; LNH: linfoma no Hodgkin; HCT-CI: *score* de comorbilidades; Ref.: referencia; Regresión de Fine Gray

La construcción del sistema de puntuación de riesgo para MLE se basó en los valores obtenidos del *hazard ratio* (HR). Se le asignó 1 punto a aquellos factores cuyo HR fue menor de 3,5 y 2 puntos si fue  $\geq 3,5$ . Los puntajes finales para los factores de riesgo incluidos fueron: sexo masculino (1 punto), edad 55-65 años (1 punto), HCT-CI riesgo alto (1 punto), linfoma de Hodgkin (1 punto), edad  $\geq 65$  años (2 puntos) y Linfoma no Hodgkin (2 puntos).

Al aplicar a la población los valores de riesgo adjudicados para cada variable: 129 pacientes (6%) obtuvieron un puntaje de 0, 557 (27%) de 1, 661 (32%) de 2, 448 (22%) de 3, 198 (10%) de 4, 65 (3%) 5 y 10 (<1%) de 6. En relación a la MLE, se observó un incremento proporcional en el riesgo relativo según el puntaje calculado considerado al grupo 0 como basal (Puntaje 1: HR 1,4, Puntaje 2: HR 1,9, Puntaje 3: HR 4,3, Puntaje 4: HR 8,5, Puntaje 5: HR 16,8 y Puntaje 6: HR 30,1;  $p < 0,001$ , prueba de Gray) (figura 18).

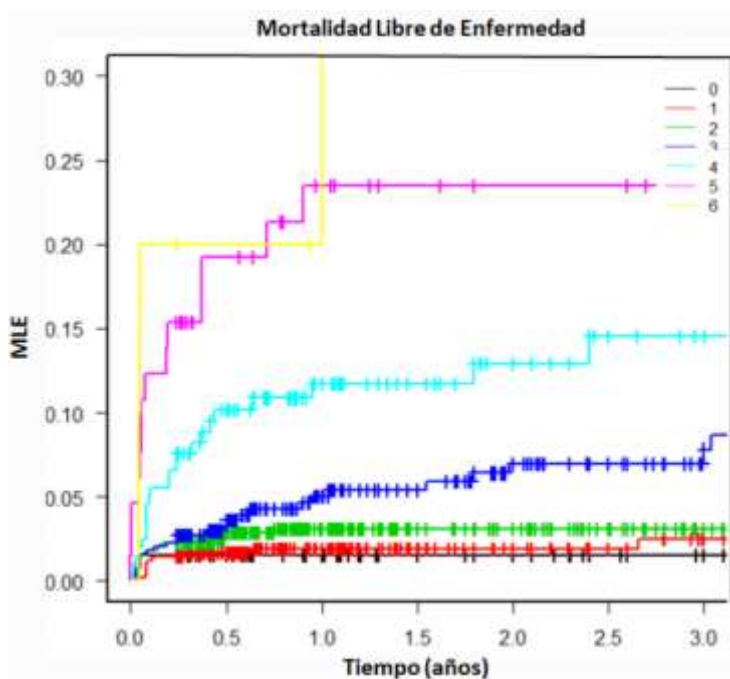


Figura 18. Curvas de incidencia acumulada de Mortalidad libre de enfermedad (MLE) en función del puntaje calculado.

El modelo final para la predicción de riesgo de MLE fue construido en base a aquellos grupos que mostraron diferencias significativas. Por lo tanto, los pacientes fueron agrupados como riesgo bajo con un puntaje de 0-1 (686 pacientes, 33%), riesgo intermedio de 2-3 (1109 pacientes, 53%), riesgo alto puntaje 4 (198 pacientes, 10%) y riesgo muy alto cuando sumaron  $\geq 5$  (75 pacientes, 4%).

### 1.6.2. Evaluación del modelo construido

La distribución de pacientes según el riesgo asignado demostró una asociación progresiva en el análisis de los eventos tempranos (dentro del día 100) sobre la necesidad de IOT-ARM, diálisis, uso de vasopresores, así como en la MLE y el evento combinado de morbi-mortalidad (tabla 15).

Tabla 15. Impacto del modelo final en la morbilidad y mortalidad temprana (día 100) post Trasplante Autólogo

	Riesgo Bajo	Riesgo Intermedio	Riesgo Alto	Riesgo Muy Alto	P (univ)
Eventos (%)					
MLE	1,5	2,4	7,6	16,0	<0,001*
IOT/ARM	2,9	4,9	10,6	22,7	<0,001¶
Requerimiento de vasopresores	1,9	5,1	9,1	18,7	<0,001¶
Diálisis	1,0	2,1	4,0	5,3	0,010¶
Morbi-Mortalidad	3,9	6,9	14,1	28,0	<0,001¶

Abreviaturas: IOT/ARM: intubación orotraqueal/asistencia respiratoria mecánica MLE, mortalidad libre de enfermedad.\*Test de Gray; ¶ chi2.

Un efecto similar se observó en la MLE a largo plazo (1-3 años 1,8-2,3% vs. 3,8-4,9% vs. 11,7-14,5% vs. 25,0-27,4%, respectivamente,  $p < 0,001$ ; riesgo bajo: ref., HR, IC 95%; riesgo intermedio 2,2, 1,2-3,9; riesgo alto 6,4, 3,3-12,2; riesgo muy alto 14, 6,9-28,2) (figura 19). Finalmente el *score* se asoció significativamente con la SG (1-5 años 94-73% vs. 89-64% vs. 76-48% vs. 65-52% respectivamente,  $p < 0,001$ ; riesgo bajo: ref., HR, IC 95%; riesgo intermedio 1,4, 1,1-1,8, riesgo alto 2,5, 1,8-3,6; riesgo muy alto 3,9, 2,6-6,1) (figura 20). No se encontró asociación con la tasa de recaída.

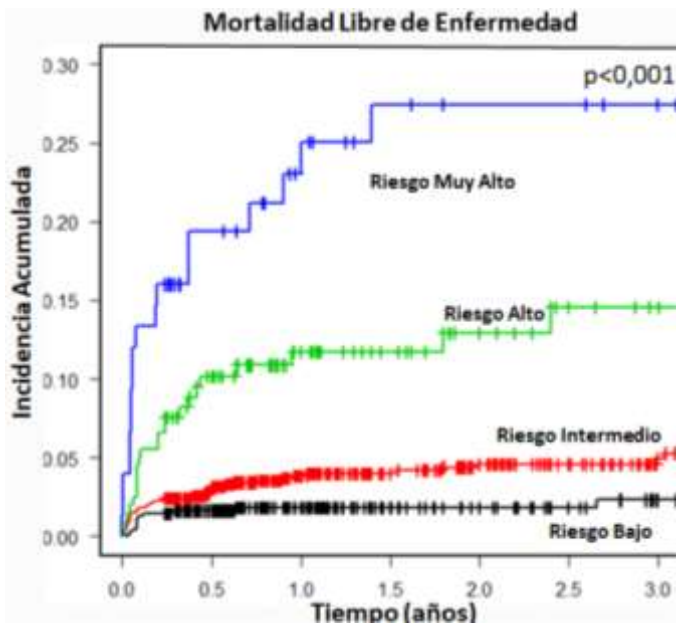


Figura 19. Curvas de incidencia acumulada para mortalidad libre de enfermedad (MLE) en función del modelo de predicción establecido.

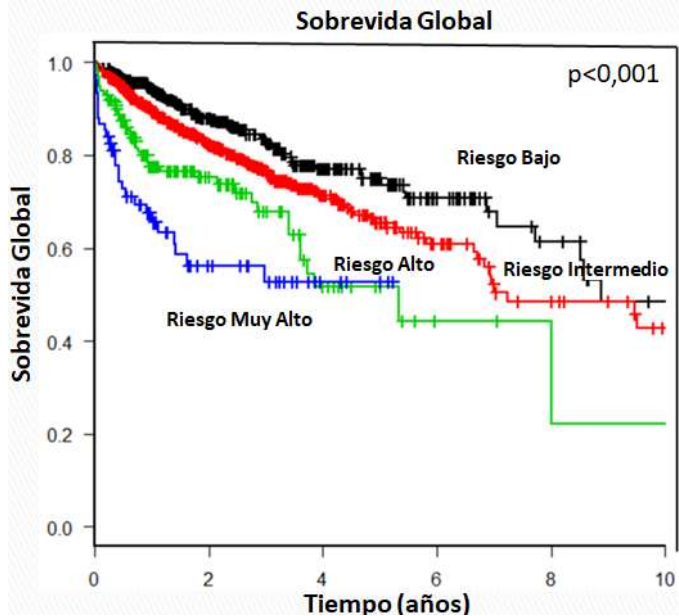


Figura 20. Curvas según Kaplan-Meier para sobrevida global en función del modelo de predicción establecido.



## **2. Impacto de las variables clínicas en el trasplante alogénico**

El objetivo de este apartado es el de identificar las variables clínicas que tuvieron una asociación con la evolución del trasplante alogénico. Se describen los resultados del análisis de los trasplantes alogénicos histoidénticos relacionados familiarmente y los NR realizados en la unidad de trasplante hematopoyético del Hospital Universitario Austral desde enero/2003-diciembre/2016 (N=285), excluyéndose los trasplantes haploidénticos. Las características de la población se describen en la tabla 16. La inmunosupresión utilizada para prevenir la EICH fue tacrolimus más curso corto de metotrexate y en el caso de los trasplantes NR se agregó globulina antilinfocitaria dado su mayor riesgo. Cerca de la mitad de los trasplantes relacionados fueron realizados en estadios tardíos de la enfermedad (52%), a diferencia de los trasplantes NR que fue del 72%.

Tabla 16. Características de la cohorte (285 pacientes)

		N (%)
Sexo	Masculino	180 (63%)
Edad (mediana 27 años)	0-15	89 (31%)
	16-29	76 (27%)
	30-49	80 (28%)
	≥50	40 (14%)
Sexo donante	Masculino	153 (56%)
Edad donante (mediana 28 años)		
CMV paciente	Positivo	225 (85%)
CMV donante	Positivo	129 (63%)
HLA compatible		231 (85%)
Riesgo según HCT-CI	Bajo	164 (57%)
	Intermedio	96 (38%)
	Alto	25 (9%)
Enfermedad de base	Leucemia Mieloide Aguda	68 (24%)
	Leucemia Linfoblástica Aguda	77 (27%)
	Síndrome Mielodisplásico	49 (17%)
	Aplasia Medular	21 (7%)
	Síndrome Linfoproliferativo	19 (7%)
	Mieloproliferativa Crónica	15 (5%)
	No malignas	22 (8%)
	otras malignas	14 (5%)
Status pre-trasplante	Avanzado	164 (57%)
Régimen de Acondicionamiento	Mieloablatoivo	176 (62%)
Fuente	Sangre Periférica	227 (80%)
	Médula ósea	41 (15%)
	Unidades Cordón Umbilical	15 (5%)
Donante	Relacionado	174 (61%)
	No Relacionado	111 (39%)

CMV: citomegalovirus; HLA: complejo mayor de histocompatibilidad; HCT-CI: *score* de comorbilidades pre trasplante.



## 2.1. Falla primaria del injerto

La falla primaria del injerto fue del 4,7% (13 casos). Este evento estuvo asociado a la fuente de CPH y el esquema de acondicionamiento empleados. Ocurrió con mayor frecuencia en los pacientes que recibieron CPH de unidades de cordón umbilical (UCU) (35%) vs. médula ósea (MO) (7,5%) vs. sangre periférica (CMSP) (2,3%) ( $p < 0,001$ , prueba  $\chi^2$ ), y en los que recibieron regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida (7,1% vs. 1,8%,  $p = 0,025$ , prueba exacta de Fisher). La mortalidad para los pacientes con fallo del injerto fue del 85% al día 100.

## 2.2. Enfermedad injerto contra huésped aguda (EICHa)

La tasa global de EICH aguda fue del 46%. Los grados II a IV (GII-IV) tuvieron una incidencia de 33% y los grados III y IV (GIII-IV) del 13%. Las patologías de base fueron reunidas en 4 grupos: leucemias agudas, linfoproliferativos crónicos, patología mieloide crónica (SMD y NMP) y patología benigna (Tabla 17). Se evidenció una reducción estadísticamente significativa de la incidencia de esta complicación con las patologías benignas, el uso de regímenes de intensidad reducida y los donantes emparentados (tabla 17).

Tabla 17. EICH aguda, variables clínicas

	EICHa (%)	<i>P</i> (univ)	EICHa II-IV (%)	<i>P</i> (univ)	EICHa III-IV (%)	<i>P</i> (univ)
<b>Patología</b>						
Leucemias Agudas	47	0,004*	30	0,030*	11	0,555*
Linfoprolif. Crónicos	44		26		15	
Mieloprolif. Crónicas	69		48		15	
Enf. Benignas	36		25		18	
<b>Acondicionamiento</b>						
Mieloablativo	52	0,150¶	37	0,030¶	13	0,855¶
Intensidad Reducida	45		24		12	
<b>Donante</b>						
Relacionado	48	0,490¶	26	0,001¶	12	0,275¶
No Relacionado	52		45		16	
<b>Fuente de progenitores</b>						
Sangre Periférica	52	0,210*	34	0,330*	13	0,775*
Médula Ósea	44		26		17	
Unid. Cordón Umbilical	27		18		9	

EICH, enfermedad injerto contra huésped; Enf. Enfermedad; Linfoprolif.: linfoproliferativo; Mieloprolif. Neoplasias mieloproliferativas crónicas; Unid.: unidad. \* Prueba  $\chi^2$ ; ¶ Prueba exacta de Fisher

### 2.3. Enfermedad injerto contra huésped crónica

La tasa de EICH crónica (EICHc) a 3 años fue del 22% y del 8,5% para las formas extensas. Este evento clínico se asoció con las diferentes fuentes de CPH, mostrando un aumento estadísticamente significativo con el uso de sangre periférica en la aparición de EICH crónica en todas sus formas (1-3 años sangre periférica 15-26% vs. médula ósea 8-8% vs. unidad de cordón umbilical 0-0%,  $p=0,025$ , prueba de Gray) y una tendencia para las formas extensas (3 años 11% vs. 0% vs. 0% respectivamente,  $p=0,100$ ; prueba de Gray) (figura 21, A y B).

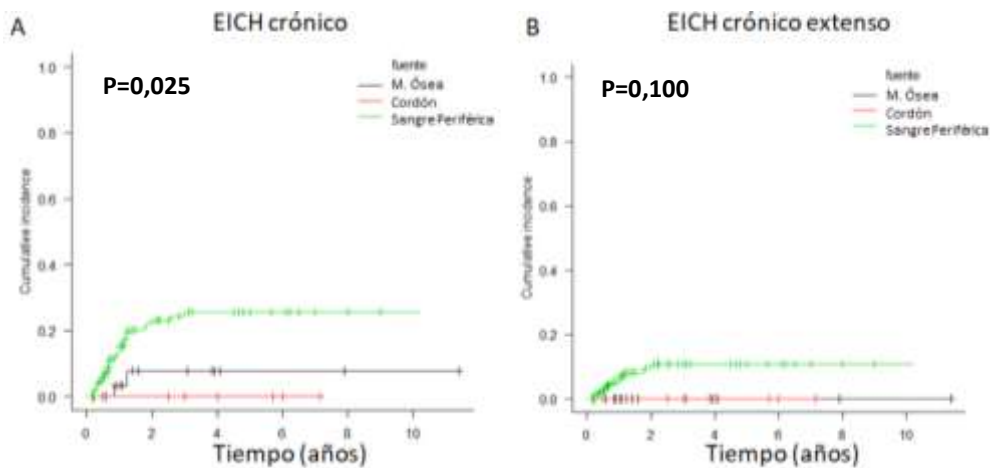


Figura 21. Curvas de incidencia acumulada de EICH crónica en función de la fuente de CPH utilizada. Global (A) y sus formas extensas (B). M.: Médula. EICH: Enfermedad de injerto contra Huésped.

La incidencia de EICH crónica también estuvo asociada al tipo de donante empleado. Los donantes emparentados presentaron un incremento en la incidencia de EICH crónica global (1-3 años 16-28% vs. 7-11%,  $p=0,006$ , prueba de Gray) y de sus formas extensas (3 años 12% vs. 2,5%,  $p=0,035$ , prueba de Gray) (figura 22).

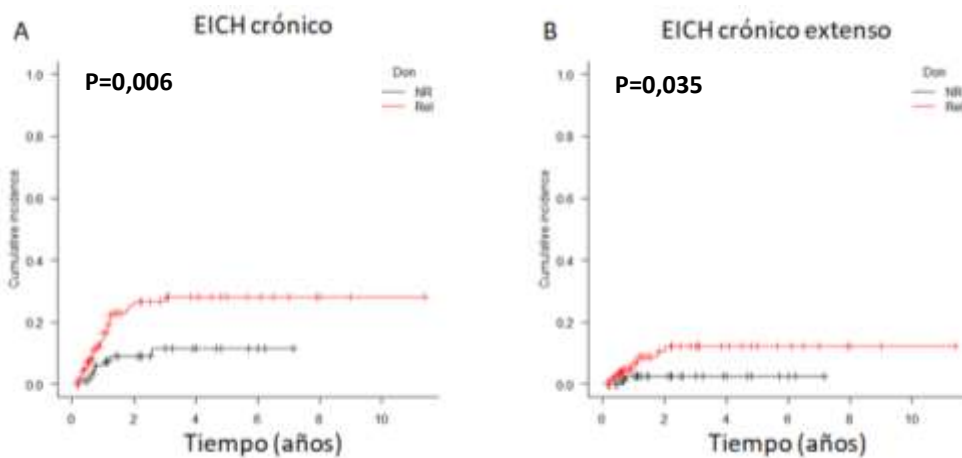


Figura 22. Curvas de incidencia acumulada de EICH crónica en función del tipo de donante. Global (A) y sus formas extensas (B). EICH: Enfermedad de injerto contra Huésped; Don: donante, NR: no relacionado; Rel: relacionado

## 2.4. Mortalidad libre de enfermedad y recaída

La MLE de toda la cohorte al día 100 fue del 16%, a los 3 años del 27%, mientras que la tasa de recaída a los 3 años fue del 28%.

Se definieron cuatro grupos etarios (0-15, 16-29, 30-49 y  $\geq 50$  años) para el análisis de MLE. Los pacientes que se encontraban en los 3 grupos más jóvenes tuvieron una tasa similar de MLE, con un claro aumento para los mayores de 50 años (1-3 años: 0-15 años, 22-22% vs. 16-29, 23-23% vs. 30-49, 24-28% vs.  $\geq 50$ , 41-41%,  $p=0,255$ , prueba de Gray) (figura 23, A). Si bien la MLE al día 100 fue similar (0-15 15% vs. 16-29 16% vs. 30-49 16% vs.  $\geq 50$  17%), los pacientes del grupo etario más avanzado presentaron mayor tasa de MLE alejada al trasplante comparado con los más jóvenes ( $\geq 50$  vs. resto  $p=0,050$ , prueba de Gray). No hubo diferencias en la tasa de recaída (figura 23, B).

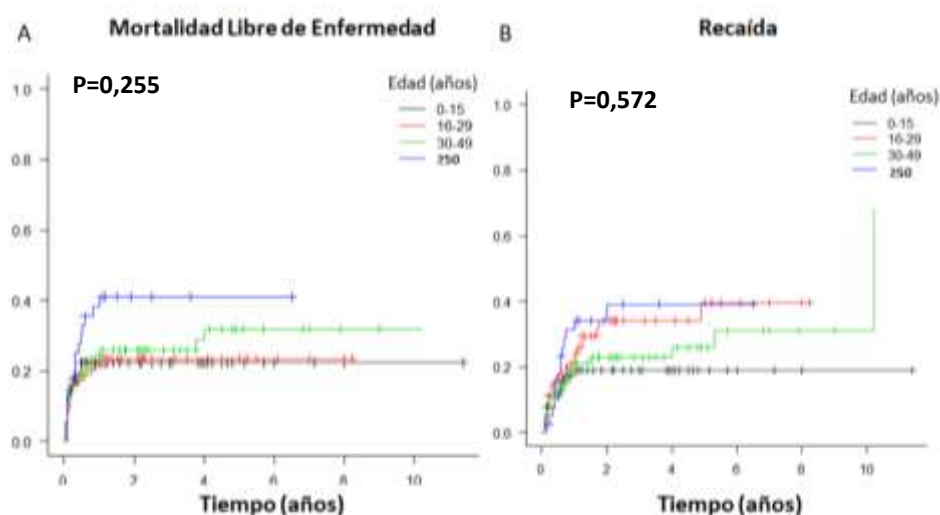


Figura 23. Curvas de Incidencia acumulada en función de la edad: Mortalidad libre de Enfermedad (A) y tasa de recaída (B)

Las comorbilidades influyeron significativamente en la MLE. Según el *score* HCT-CI, los pacientes de riesgo intermedio/alto tuvieron un incremento significativo de la MLE comparado con los de riesgo bajo tanto para el evento temprano (día 100 22% vs 11%) como para el tardío (1-3 años 35-38% vs. 18-20%,  $p<0,001$ , prueba de Gray) (figura 24, A). No se observaron diferencias en la tasa de recaída en función del HCT-CI (figura 24, B).

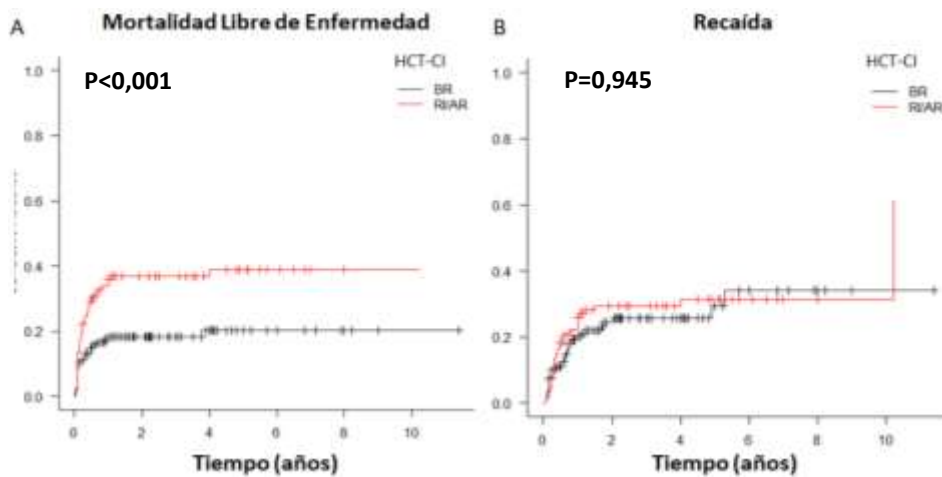


Figura 24. Curvas de incidencia acumulada de mortalidad libre de enfermedad (A) y tasa de recaída (B) en función del HCT-CI (*score* de comorbilidades) BR (riesgo bajo) vs. RI/AR (riesgo intermedio/alto)

El uso de donante NR se asoció con un incremento en la MLE tanto temprana (día 100: 25% vs. 10%) como a largo plazo (1-3 años: 39-40% vs. 17-18%,  $p < 0,001$ , prueba de Gray) (figura 25, A), sin modificaciones en la tasa de recaída (figura 25, B). La intensidad del esquema de acondicionamiento no influyó de manera significativa en la MLE ni en la recaída.

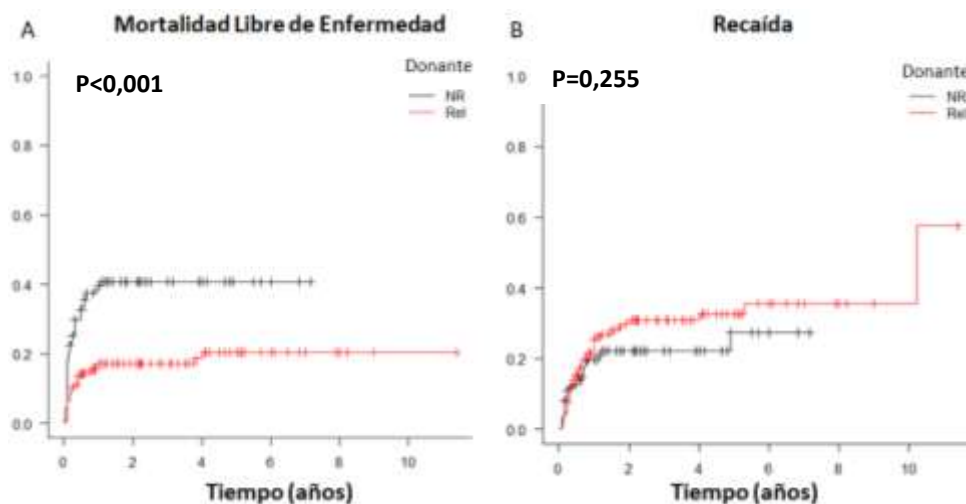


Figura 25. Curvas de incidencia acumulada de mortalidad libre de enfermedad (A) y tasa de recaída (B) en función del donante. Rel: relacionado, NR: no relacionado.

El análisis de la MLE en función de la patología de base (patología benigna, leucemias agudas, linfoproliferativa crónica, mieloides crónicas) no demostró diferencias, al igual que el recibir un trasplante en etapas tempranas vs. tardías. Sin embargo, esta última clasificación se asoció con un incremento en la tasa de recaída (3 años: 13% vs. 35%,  $p < 0,001$ , prueba de Gray). El resto de las variables analizadas (sexo del paciente o

donante, edad del donante, serologías para citomegalovirus, compatibilidad HLA o fuente) no presentaron diferencias significativas en las tasas de MLE ni en la de recaída.

Tras el análisis multivariado (regresión según Cox), los dos factores que presentaron un efecto independiente en la MLE fueron las comorbilidades según el *score* HCT-CI (riesgo intermedio/alto vs. riesgo bajo: HR 3,18, IC 95% 1,52-6,66) y el tipo de donante (NR vs. emparentados: HR 2,69, IC 95% 1,41-5,15) (tabla 18).

Tabla 18. Análisis multivariado de mortalidad libre de enfermedad

		P	Hazard Ratio	IC 95%	
				Inferior	Superior
Edad de los pacientes	≥50 años	0,875	1,03	0,66	1,60
Donante	No relacionado	0,002	2,69	1,41	5,15
Fuente	Sangre periférica	0,111	0,52	0,23	1,14
Serología de CMV del donantes	Negativa	0,865	0,94	0,50	1,77
Régimen de Acondicionamiento	Mieloablativo	0,955	1,02	0,57	1,81
Riesgo según HCT-CI	Alto/intermedio	0,002	3,18	1,52	6,66

HCT-CI: *score* de comorbilidades pre-trasplante; CMV: citomegalovirus; IC: intervalo de confianza. Regresión según Cox

En el análisis multivariado para la recaída, el *status* pre trasplante mostró un efecto independiente. Aquellos pacientes trasplantados en estadios avanzados tuvieron un incremento estadísticamente significativo (HR 2,43, IC 95% 1,27-4,64) (tabla 19).

Tabla 19. Análisis multivariado de recaída

		P	Hazard Ratio	IC 95%	
				Inferior	Superior
Edad donantes	<30 años	0,499	0,83	0,48	1,41
Patología de Base	Malignas	0,099	2,80	0,83	9,49
Estadio pre-trasplante	Avanzado	0,005	2,43	1,27	4,64
Donante	Relacionado	0,222	1,44	0,80	2,59
Régimen de Acondicionamiento	Mieloablativo	0,955	1,02	0,57	1,81

IC: intervalo de confianza. Regresión según Cox

## 2.5. Sobrevida libre de enfermedad y sobrevida global

La tasa de Sobrevida Global (SG) y Sobrevida Libre de Enfermedad (SLE) a 3 años fue del 53% y 45% respectivamente.

Los pacientes con un *score* HCT-CI riesgo intermedio/alto presentaron una menor SLE (1-3 años: 41-34% vs. 66-59%, p=0,001, prueba de log-rank) (figura 26 A) y SG (1-3 años: 48-37% vs. 71-66%, p=0,001, prueba de log-rank) (figura 26 B) comparado con los de bajo riesgo.

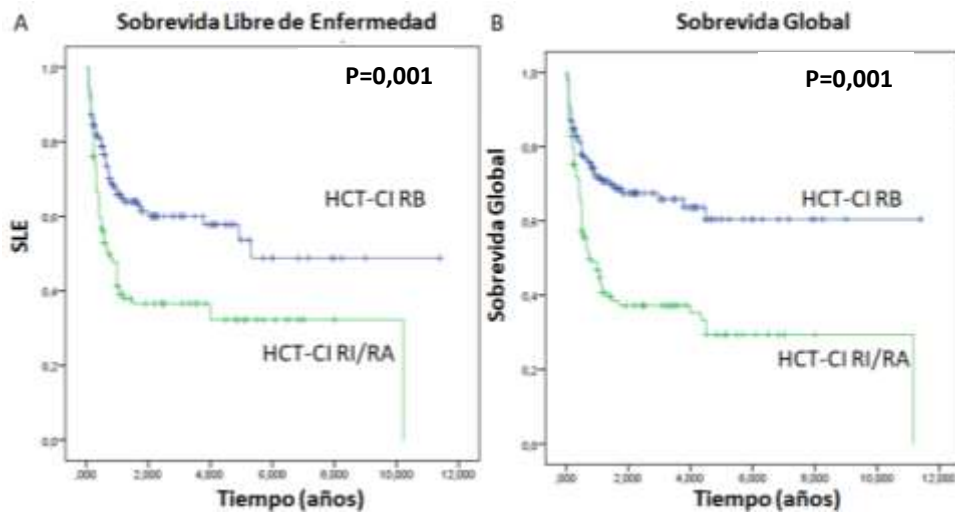


Figura 26. Curvas según Kaplan-Meier para sobrevida libre de enfermedad (SLE) (A) y sobrevida global (B) de acuerdo a las comorbilidades en base al *score* HCT-CI (RB: riesgo bajo; RI/RA: riesgo intermedio/alto).

Los pacientes que recibieron un trasplante con donante NR tuvieron una disminución significativa en la SLE (1-3 años 40-35% vs. 60-51%,  $p=0,001$ , prueba de log-rank) (figura 27 A) y en la SG (1-3 años 49-42% vs. 68-60%,  $p=0,001$ , prueba de log-rank) (figura 27 B) comparado con los que recibieron CPH de un donante emparentado histoidéntico.

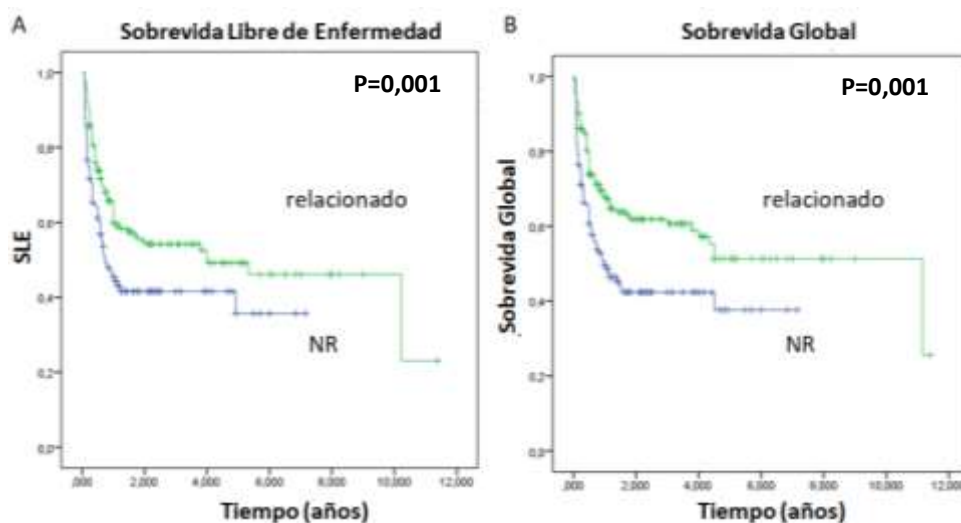


Figura 27. Curvas según Kaplan-Meier para sobrevida libre de enfermedad (SLE) (A) y sobrevida global (B) de acuerdo al tipo de donante utilizado. NR: no relacionado.

De acuerdo a la intensidad del régimen de acondicionamiento, los pacientes que recibieron un esquema de intensidad reducida presentaron una disminución significativa de la SLE (1-3 años 47-37% vs. 59-53%,  $p=0,040$ , prueba de log-rank) y de la SG (1-3 años 55-45% vs. 65-59%,  $p=0,025$ , prueba de log-rank) comparado con los que recibieron un acondicionamiento mieloablativo.

En función del *status* de la enfermedad, los paciente que recibieron un trasplante en estadios avanzados tuvieron una disminución significativa de la SLE (1-3 años 44-36% vs. 71-67%,  $p < 0,001$ , prueba de log-rank) (figura 28 A) y de la SG (1-3 años 52-42% vs. 73-68%,  $p < 0,001$ , prueba de log-rank) (figura 28 B) comparado con los que recibieron un trasplante en estadios tempranos.

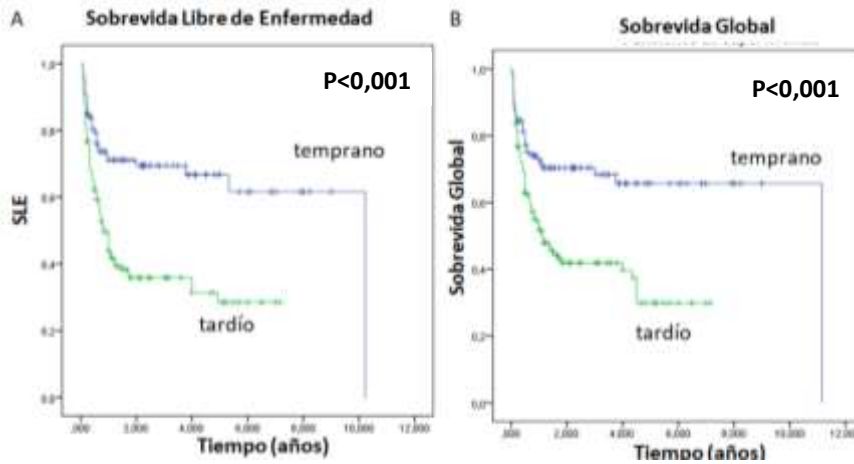


Figura 28. Curvas según Kaplan-Meier para sobrevida libre de enfermedad (SLE) (A) y de sobrevida global (B) de acuerdo al *status* de la enfermedad al momento del trasplante.

Los pacientes menores de 15 años tuvieron una mayor SLE y SG mientras que los pacientes mayores de 50 años presentaron los porcentajes más bajos. La evolución de los grupos 16-29 y 30-49 años fue similar (SLE: 1-3 años 0-15 años 64-64% vs. 16-29 años 56-48% vs. 30-49 años 58-50% vs.  $\geq 50$  años 26-20%,  $p = 0,002$ , prueba de log-rank, figura 29 A; y SG: 1-3 años 1-3 años 0-15 años 69-65% vs. 16-29 años 64-59% vs. 30-49 años 61-53% vs.  $\geq 50$  años 38-20%,  $p = 0,005$ , prueba de log-rank, figura 29 B).

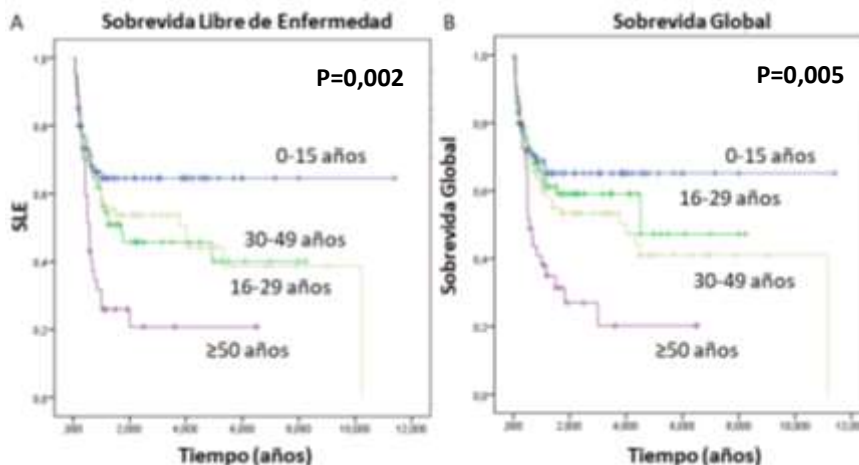


Figura 29. Curvas según Kaplan-Meier para sobrevida libre de enfermedad (SLE) (A) y sobrevida global (B) de acuerdo a los diferentes grupos etarios.

Los pacientes que recibieron un trasplante con donante  $\geq 30$  años de edad tuvieron una disminución significativa de la SLE (1-3 años: 47-39% vs. 55-53%,  $p = 0,045$ , prueba de log-rank) sin diferencias significativas en la SG.



Se realizaron análisis multivariados para SG y SLE unificando los grupos etarios 16-29 con 30-49 por el comportamiento similar evidenciado en el análisis univariado. Los factores que mostraron una asociación independiente fueron el *status* pre-trasplante, los donantes NR y el HCT-CI (regresión según Cox, tablas 20 y 21).

Tabla 20. Análisis multivariado de sobrevida global

		P	Hazard Ratio	IC 95%	
				Inferior	Superior
Edad pacientes (años)	0-15	ref.			
	16-49	0,755	1,09	0,61	1,95
	≥50	0,500	1,30	0,60	2,80
Edad donante (años)	≥30	0,395	1,22	0,77	1,92
Status pre-trasplante	Avanzado	<0,010	1,93	1,19	3,13
Donante	No relacionado	<0,010	1,79	1,17	2,74
Régimen de Acondicionamiento	Intensidad reducida	0,725	1,09	0,66	1,80
Patología de Base	Benignas	ref.			
	Leucemias Agudas	0,090	2,02	0,89	4,56
	Linfoproliferativas	0,385	1,52	0,59	3,91
	NMP/SMD	0,322	1,53	0,65	3,63
Riesgo según el HCT-CI	Intermedio/Alto	0,001	2,10	1,34	3,31

NMP/SMD: neoplasias mieloproliferativas crónicas/síndromes mielodisplásicos; HCT-CI: *score* de comorbilidades; IC, intervalo de confianza; ref, referencia. Regresión según Cox

Tabla 21. Análisis multivariado de sobrevida libre de enfermedad

		P	Hazard Ratio	IC 95%	
				Inferior	Superior
Edad pacientes (años)	0-15	ref.			
	16-49	0,933	1,02	0,59	1,76
	≥50	0,765	1,19	0,53	2,33
Edad donante (años)	≥30	0,125	1,40	0,91	2,17
Status pre-trasplante	Avanzado	<0,010	1,85	1,18	2,90
Donante	No relacionado	<0,010	1,81	1,21	2,70
Régimen de Acondicionamiento	Intensidad reducida	0,435	1,20	0,75	1,94
Patología de Base	Benignas	ref.			
	Leucemias Agudas	0,100	1,86	0,88	3,93
	Linfoproliferativss.	0,465	1,38	0,58	3,31
	NMP/SMD	0,425	1,38	0,62	3,07
Riesgo según HCT-CI	Alto/intermedio	<0,010	1,79	1,17	2,73

NMP/SMD: neoplasia mieloproliferativas crónicas/síndromes mielodisplásicos; HCT-CI: *score* de comorbilidades; IC, intervalo de confianza; Ref., referencia. Regresión Cox

## 2.6. Variables clínicas en el trasplante alogénico en pacientes mayores.

EL objetivo de este apartado es el de evaluar los factores de riesgo clínicos asociados al trasplante alogénico en pacientes mayores, realizados en nuestro medio. Se efectuó un análisis retrospectivo de 137 trasplantes alogénicos en pacientes mayores de 50 años realizados en Argentina durante el período entre 1997 y 2013. Se evaluaron las



siguientes características: sexo, edad, presencia de comorbilidades (según *score* de HCT-CI), enfermedad de base, *status*, tipo y características de los donantes, regímenes de acondicionamiento e inmunosupresión.

La mediana de edad de los pacientes fue de 55 años, el 13% tenía un *score* HCT-CI  $\geq 3$ , el 67% se trasplantó en etapas tardías y el 83% recibió un trasplante de donante relacionado. Las características principales de la cohorte se describen en la tabla 22.

Tabla 22. Características de la Cohorte (N=137)		N (%)
Edad de pacientes (mediana 55 años)	< 60 años	113 (82)
	$\geq 60$ años	24 (18)
Edad donantes	< 50 años	47 (34)
	$\geq 50$ años	57 (42)
	Dato faltante	33
Sexo pacientes	Masculinos	90 (66)
	Femenino	47 (34)
Sexo donantes	Masculino	77 (56)
	Femenino	54 (39)
	Dato faltante	6
<i>Score</i> HCT-CI	0	51 (37)
	1	37 (27)
	2	18 (13)
	$\geq 3$	17 (13)
	Dato faltante	14
Patología de base	Leucemia Mieloide Aguda	50 (36)
	Síndrome Mielodisplásico	40 (29)
	Neoplasia Mieloproliferativa	24 (17)
	Linfoproliferativos	10 (7)
	Otras malignas	12 (9)
<i>Status</i> de la enfermedad	Temprano	45 (33)
	Tardío	92 (67)
Régimen de acondicionamiento	Mieloablativo	33 (24)
	Intensidad Reducida	104 (76)
Esquemas de acondicionamiento	Fludarabina-Melfalán	34 (24)
	Fludarabina-Busulfán	49 (36)
	Fludarabina-ICT	11 (8)
	Busulfán-Ciclofosfamida	25 (18)
	Otros	18 (13)
Donante	Relacionado	113 (83)
	No relacionado	24 (17)
Fuente de progenitores	Sangre Periférica	117 (85)
	Médula Ósea	30 (15)
Esquemas de Inmunosupresión	Tacrolimus +	93 (68)
	Ciclosporina +	44 (32)

Abreviaturas: HCT-CI, *score* de comorbilidades pre trasplante; ICT: Irradiación Corporal Total.

### 2.6.1. Enfermedad injerto contra huésped aguda

La incidencia global de EICH aguda en este grupo fue de 41%. En el 19% grados II a IV (GII-IV) y 7,3% grados III y IV (GIII-IV). La única variable que mostró una asociación con EICH aguda fue la enfermedad de base. Los pacientes con diagnóstico previo de LMA presentaron menor incidencia de EICH aguda GII-IV al

compararlos con los restantes diagnósticos (14% vs. 34%,  $p < 0,010$ , prueba exacta de Fisher), lo cual fue significativo tras el análisis multivariado (OR 0,29; IC 95% 0,12-0,72, regresión logística).

### 2.6.2. Enfermedad injerto vs. huésped crónica

La incidencia de EICH crónica fue del 25%, siendo extenso en 9,4% de los pacientes. La única variable asociada a este evento fue el diagnóstico de neoplasia mieloproliferativa, con un incremento en la incidencia de EICH crónica (1 y 3 años: 40-40% vs. 12-20%,  $p = 0,010$ , test de Gray).

### 2.6.3. Mortalidad libre de enfermedad y recaída

La tasa de recaída a 1 y 3 años fue de 35% y 41%, y la de MLE de 36 y 40% respectivamente. La presencia de comorbilidades influyó negativamente en la MLE. Si bien el *score* original agrupa a los pacientes como riesgo alto con un puntaje  $\geq 3$ , en el análisis univariado se encontró una mejor asociación con el punto de corte en 2 (HCT-CI 0 vs. 1 vs.  $\geq 2$ : 1-3 años 17-24% vs. 40-46% vs. 45-67%,  $p = 0,001$ , prueba de Gray) (figura 30 A).

Asimismo, el sexo masculino se asoció con una mayor MLE (1-3 años 36-47% vs. 23-27%,  $p = 0,010$ , prueba de Gray; figura 30 B), al igual que el uso de profilaxis para EICH con ciclosporina vs. tacrolimus (1-3 años 47-53% vs. 25-36%,  $p < 0,010$ , prueba de Gray) (figura 30 C). La edad ( $>60$  años vs.  $\leq 60$  años) sólo mostró una tendencia en relación a este evento (1-3 años 17-23 vs. 34-43%,  $p = 0,08$ ).

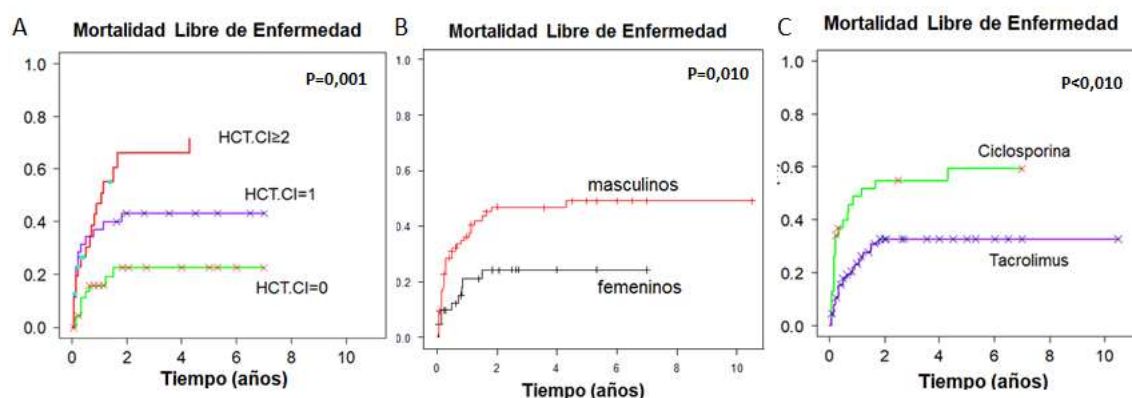


Figura 30. Curva de incidencia acumulada de mortalidad libre de enfermedad. A; en función del HCT.CI (score de comorbilidades pre trasplante). B: en función del sexo. C: en función del inmunosupresor utilizado.

El análisis multivariado (regresión según Cox) confirmó la independencia de la presencia de comorbilidades (HCT-CI 0 vs.  $\geq 1$ , HR 2,1, IC 95% 1,01-4,37) y del sexo masculino (HR 2,32, IC 95% 1,07-5,06) en relación al incremento de la MLE. Mientras que, los regímenes de inmunosupresión basados en ciclosporina sólo mostraron una tendencia desfavorable (tabla 23).

Tabla 23. Análisis multivariado de mortalidad libre de enfermedad

		P	Hazard Ratio	IC 95%	
				Inferior	Superior
Edad pacientes	$\geq 60$ años	0,222	0,71	0,26	1,96
Enfermedad de base	Leucemias Agudas	0,355	0,70	0,33	1,46
Riesgo según HCT-CI	Intermedio/Alto	0,040	2,09	1,01	4,37
Sexo pacientes	Masculino	0,030	2,32	1,07	5,06
Status	Avanzado	0,885	1,06	0,44	2,59
Régimen de Inmunosupresión	Ciclosporina +	0,066	1,88	0,97	3,64

HCT-CI: score de comorbilidades pre trasplante. IC, intervalo de confianza. Regresión según Cox

El único parámetro asociado a la recaída fue la enfermedad de base. Los pacientes con LMA tuvieron una tasa mayor de recaída (1-3 años 53-56% vs. 27-29%,  $p=0,010$ , prueba de Gray) cuando se lo comparado con los otros diagnósticos.

#### 2.6.4. Sobrevida libre de enfermedad y sobrevida global

La SG a 1 y 3 años fue del 44% y 20%, mientras que la SLE fue del 33% y 19% respetivamente. Los pacientes que recibieron tacrolimus como base de la terapia inmunosupresora presentaron mayor SLE (1-3 años 41-27% vs. 17-8%,  $p=0,010$ , prueba log-rank) (figura 31 A) y SG (1-3 años 50-25% vs. 31-13%,  $p=0,010$ , prueba de log-rank) (figura 31 B) comparados con quienes recibieron ciclosporina. Este parámetro mantuvo su valor independiente en el análisis multivariado para la SLE (HR 0,54, IC 95% 0,31-0,95, regresión de Cox) (Tabla 24).

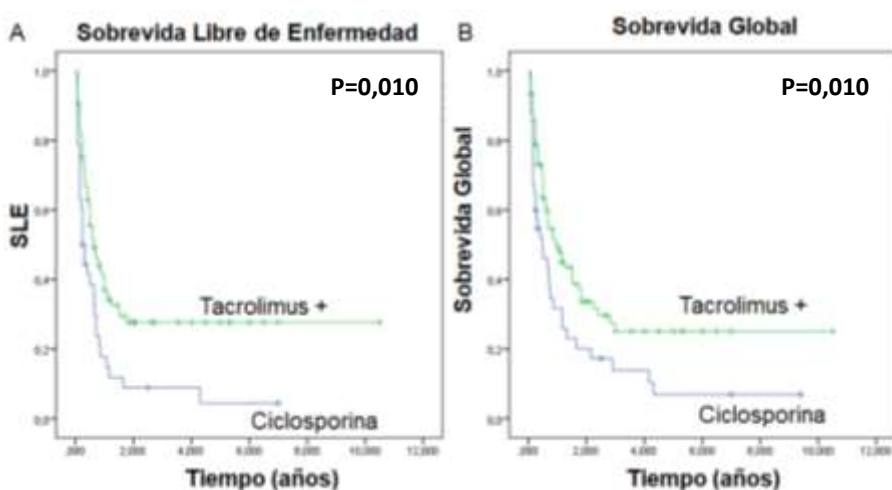


Figura 31. Curvas según Kaplan-Meier de sobrevida libre de enfermedad (A) y sobrevida global (B) de acuerdo al inmunosupresor utilizado en la profilaxis para la enfermedad de injerto vs. huésped.

Los pacientes sin comorbilidades (HCT-CI 0 vs.  $\geq 1$ ) mostraron una tendencia a una mayor SLE (1-3 años 42-30% vs. 30-16%,  $p=0,052$ , prueba de log-rank) (figura 32 A) al igual que una SG más prolongada (1-3 años 54-30% vs 38-17%,  $p=0,055$ , prueba de log-rank) (figura 32 B). Los pacientes mayores de 60 años no mostraron diferencias significativas en la SLE (1-3 años 46-35% vs. 31-18%,  $p=0,135$ , prueba de log-rank), Sin embargo, estos pacientes presentaron mayor SG que los pacientes entre 50 y 60 años (1-3 años 59-45% vs. 41-18%,  $p=0,025$ , prueba de log-rank), sin sostener su valor pronóstico independiente. De este grupo de pacientes mayores de 60 años, sólo un 13% tuvo un HCT-CI mayor de 1 (vs. 32% para los paciente 50-60 años), 12% fueron trasplantes con donantes NR (vs. 18%) y 12% con acondicionamiento mieloablativo (vs. 26%). El tipo de donante o su edad, el uso de regímenes de acondicionamiento mieloablativos y la fuente de progenitores hematopoyéticos no mostraron asociación con ninguno de los eventos estudiados.

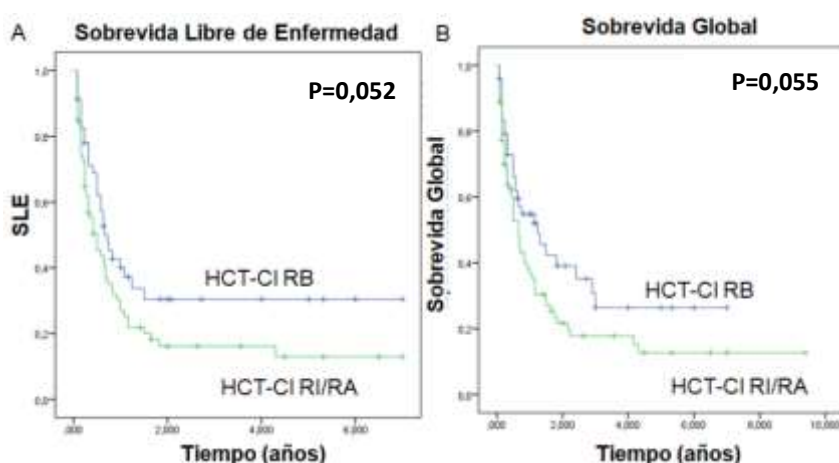


Figura 32. Curvas según Kaplan-Meier de sobrevida libre de enfermedad (A) y sobrevida global (B) de acuerdo al *score* HCT-CI. RB: riesgo bajo, RI/RA: riesgo intermedio/alto

Tabla 24. Análisis multivariado de sobrevida libre de enfermedad

		<i>P</i>	<i>Hazard Ratio</i>	<i>IC 95%</i>	
				Inferior	Superior
Edad pacientes	$\geq 60$ años	0,522	1,24	0,63	2,47
Enfermedad de Base	Leucemias Agudas	0,050	1,59	0,98	2,55
Riesgo según HCT-CI	Intermedio/Alto	0,215	1,38	0,83	2,29
Esquema de acondicionamiento	Flu-Bu	0,977	1,00	0,60	1,66
HLA	Incompatible	0,815	1,10	0,49	2,46
Donante	Emparentado	0,090	0,54	0,27	1,10
Esquema de Inmunosupresión	Tacrolimus +	0,030	0,54	0,31	0,95

HCT-CI: *score* de comorbilidades pre-trasplante; Flu-Bu, fludarabina-busulfán; HLA: complejo mayor de histocompatibilidad; IC: Intervalo de confianza. Regresión según Cox

Sin embargo, ningún factor de riesgo evaluado mostró un valor independiente tras el análisis multivariado para SG (tabla 25). Sólo la leucemia aguda como enfermedad de base mostró una tendencia como factor adverso (P=0,08).

Tabla 25. Análisis multivariado de sobrevida global

		<i>P</i>	Hazard Ratio	IC 95%	
				Inferior	Superior
Edad pacientes	≥60 años	0,233	1,53	0,75	3,10
Enfermedad de base	Leucemias Agudas	0,080	1,51	0,95	2,39
Riesgo según HCT-CI	Intermedio/Alto	0,185	1,39	0,85	2,28
Régimen de acondicionamiento	Flu-Bu	0,988	1,00	0,61	1,64
HLA	Incompatible	0,475	1,36	0,58	3,16
Donante	Emparentado	0,645	0,84	0,40	1,74
Esquema Inmunosupresor	Tacrolimus +	0,266	0,73	0,43	1,26

HCT-CI: *score* de comorbilidades pre trasplante; Flu-Bu, fludarabina-busulfaán; HLA: complejo mayor de histocompatibilidad; IC: intervalo de confianza. Regresión Cox

# **DISCUSIÓN**

*El trasplante de CPH constituye una estrategia de tratamiento potencialmente curativa en numerosas patologías. Este procedimiento se asocia a graves complicaciones y se han descrito distintos factores de riesgo vinculados a las mismas.*

*En este capítulo se describe la relación de factores de riesgo clínicos con los resultados en los distintos tipos de trasplante, con un especial enfoque en la MLE.*

*En el escenario del trasplante autólogo se validó la aplicabilidad del score HCT-CI y se logró establecer un nuevo sistema de predicción de riesgo basado en la sumatoria de comorbilidades con otros factores clínicos.*

*En el contexto del trasplante alogénico, a las variables antes mencionadas, se suma la intensidad del régimen, la patología de base y su status pretrasplante. Desde la perspectiva del donante, cobran relevancia la histocompatibilidad y el parentesco.*

## **1. Variables clínicas en el trasplante autólogo**

*Las comorbilidades evaluadas en función del score HCT-CI afectan significativamente la tasa de MLE del TCPH autólogo. El efecto negativo de las comorbilidades se refleja en una toxicidad temprana, influyendo en la necesidad de requerimiento de ARM, indicación de vasopresores o diálisis como eventos de morbilidad así como en la MLE. Al combinar el HCT-CI con otras variables clínicas como la edad, el sexo masculino y la patología de base se desarrolló un nuevo sistema de puntuación que predice la MLE y la SG de manera estadística y clínicamente significativa.*

El trasplante autólogo de CPH es un procedimiento de menor mortalidad que el trasplante alogénico (Suciu, Blood 2003). Esto se debe a que los progenitores infundidos no producen un choque inmunológico al ser del propio paciente, por lo que no es necesario administrar inmunosupresores luego del trasplante. De ese modo, las complicaciones son producto de la toxicidad del régimen mieloablativo, destacándose entre todas las hematológicas. Las infecciones son la principal causa de morbimortalidad post trasplante autólogo y ocurren principalmente durante el período de neutropenia, que tiene una duración acotada y, habitualmente, no supera las dos semanas (Saad, Biol Blood Marrow Transplant 2014).

La presente serie representa una población numerosa de trasplantes autólogos realizados en Argentina. Las características de la misma son similares a las descritas en los trabajos de registros en cuanto a mediana de edad, relación masculino/femenino, patología de base y *status* pre-trasplante (Jagowski, Biol Blood Marrow Transplant 2014; Sorrow, Biol Blood Marrow Transplant 2015). La incidencia de MLE es comparable con las comunicaciones publicadas durante los últimos años, aproximadamente de un 2 a 4% al día 100 y 5 a 6% a los 3 años (Sorrow, Bone Marrow Transplant 2015). La presencia de comorbilidades, agrupadas según el *score* HCT-CI, se asociaron de manera negativa con la sobrevida post trasplante. Los eventos de morbilidad temprana analizados, necesidad de intubación oro-traqueal, vasopresores y diálisis, se incrementaron proporcionalmente con el puntaje según el HCT-CI. A la vez, el riesgo de MLE al día 100 para los pacientes de riesgo bajo fue menor al 2%, superior al 3% para el riesgo intermedio y del 6% para el riesgo alto. La probabilidad de MLE a largo plazo fue 3 veces superior para los pacientes de HCT-CI de riesgo alto en comparación con los de riesgo bajo e intermedio.

El valor predictivo del *score* HCT-CI en el trasplante autólogo fue evaluado previamente en un escaso número de series, las cuales mostraron algunos resultados disímiles, probablemente, debido a algunas limitaciones de las series estudiadas como su carácter retrospectivo y los tamaños poblacionales pequeños o la circunscripción a una única patología de base (Labonte, *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; Jaglowsky, *Biol Blood Marrow Transplant* 2014).

Coincidente con los hallazgos del presente análisis, Labonte y col. describieron un incremento de la toxicidad temprana del trasplante en los pacientes con HCT-CI de riesgo alto a partir de una cohorte de 125 pacientes con mieloma múltiple (Labonte, *Biol Blood Marrow Transplant* 2008). Los autores utilizaron los criterios de toxicidad del régimen descrito por Bearman y col. pertenecientes al *Fred Hutchinson Cancer Research Center* de Seattle, la cual se gradúa del 0 (ninguna) a 4 (fatal) (Bearman, *J Clin Oncol* 1988).

En el presente abordaje se definió morbilidad temprana a eventos graves como el requerimiento de intubación oro-traqueal, el empleo de vasopresores y la indicación de diálisis. Se considera que la magnitud de estas complicaciones refleja una severidad clínica de mayor relevancia con impacto en la mortalidad, la complejidad hospitalaria y los costos asociados al trasplante (Khassawneh, *Chest* 2002; Allareddy, *Bone Marrow Transplant* 2014; Boyaci, *Hematology* 2014; Bayraktar, *World J Clin Oncol* 2016). Los pacientes transferidos a la unidad de cuidados intensivos en el período temprano post trasplante presentan un incremento significativo de la mortalidad. En un análisis retrospectivo realizado en EE.UU., con más de 6000 pacientes que recibieron un trasplante hematopoyético, quienes requirieron ARM tuvieron una mortalidad cercana al 50% (Allareddy, *Bone Marrow Transplant* 2014). La incidencia de la falla renal aguda con requerimiento de diálisis luego de trasplante autólogo varía entre 6-13%. Esta falla puede ser secundaria a toxicidad del acondicionamiento, a un evento de sepsis o a los antibióticos utilizados e implica un incremento significativo del riesgo de MLE en comparación con los que no presentaron la complicación (Kogon, *Semin Nephrol* 2010). Por último, el uso de vasopresores en este escenario demostró ser un factor de riesgo independiente de mortalidad. Trinkaus y col. describieron un análisis retrospectivo de más de 1000 pacientes que recibieron un trasplante autólogo, de los cuales, el 3,3% requirió soporte en la unidad de cuidados intensivos, con una mortalidad del 70% para aquellos que necesitaron soporte vasopresor (Trinkaus, *Bone Marrow Transplant* 2009),



Dentro de los escasos antecedentes de validación del HCT-CI en pacientes sometidos a trasplante autólogo, Jaglowsky y col. no encontraron un incremento significativo en la MLE en 600 pacientes trasplantados por mieloma múltiple o linfomas (Jaglowsky, Biol Blood Marrow Transplant 2014). Sorror y col., los autores originales del *score*, publicaron el estudio con mayor número de casos al incluir más de 11000 trasplantes autólogos pertenecientes a los centros estadounidenses del CIBMTR. Tomando como punto de comparación los pacientes con HCT-CI de riesgo bajo, este trabajo prospectivo demostró un incremento significativo de la MLE para los pacientes de HCT-CI de riesgo alto, sin diferencias significativas para los de riesgo intermedio (Sorror, Biol Blood Marrow Transplant 2015). Graf y col. describieron resultados similares tras analizar más de 700 trasplantes autólogos por linfomas, con un incremento cercano a 2 veces de la probabilidad de MLE para los pacientes con HCT-CI de riesgo alto (Graf, Biol Blood Marrow Transplant 2016).

Uno de los trabajos más notables en este campo fue un estudio previo del CIBMTR que describió 1100 trasplantes en pacientes con diagnóstico de MM. Los autores no lograron demostrar un incremento en la MLE en función del *score*, quizás debido a la baja tasa de la misma (1-2%) en una población acotada a esa patología (Saad, Biol Blood Marrow Transplant 2014). El sub-análisis en MM del presente estudio coincide también con una baja MLE. La diferencia con la evaluación desarrollada es que se encontró una mayor incidencia de morbi-mortalidad temprana para los pacientes de riesgo alto según el HCT-CI. En la publicación del CIBMTR, no analizaron eventos tempranos de morbilidad.

Por otro lado, Sorror y col. describieron una reducción en la SG de cercana al 10% para los pacientes de riesgo alto en comparación con los de riesgo bajo (Sorror, Biol Blood Marrow Transplant 2015). El análisis de nuestra población no encontró una asociación con la SG, posiblemente por el tamaño de la misma. Sin embargo, se observó un impacto en la SG en el sub-análisis de pacientes con diagnóstico de linfoma. El linfoma como enfermedad de base, en particular el LNH, se mantuvo como variable independiente de riesgo, duplicando el evento combinado de morbi-mortalidad y triplicando la MLE. Estos pacientes requirieron, en mayor proporción, el uso de asistencia respiratoria mecánica y el empleo de vasopresores. Si bien no hay análisis que comparen en una misma población la MLE de los pacientes con LNH *versus* otras patologías, los análisis de poblaciones individuales describen una mayor MLE para estos pacientes (5-8% a 1 año y 11% a 3 años) que la observada para los pacientes con

MM (2% a 1 año y 4-7% a 3 años) o LH (3-6% a 1 año y 8% a 3 años). Posiblemente esto se deba a que la mayoría de los pacientes con linfomas se trasplantan en segunda línea, a diferencia del MM que la indicación del trasplante autólogo es en primera línea (Jantunen, Haematologica 2008; Chiara, Biol Blood Marrow Transplant 2014; Saad, Biol Blood Marrow Transplant 2014; Sorrow, Biol Blood Marrow Transplant 2015; Kako, Am J Hematol 2015; Martinez, Ann Hematol 2017).

Diversas publicaciones han evaluado el impacto de diferentes factores de riesgo más allá de las comorbilidades en el trasplante autólogo de CPH. En el presente estudio, la edad se asoció con la MLE a largo plazo sin influir en la morbilidad ni en la mortalidad temprana. La edad se asocia a una disminución en la SG luego del trasplante autólogo de CPH principalmente relacionada a una mayor MLE, si bien existe controversia sobre este punto (Bitran, Biol Blood Marrow Transplant 2003; Ludwig, Blood 2008; Jantunen, Haematologica 2008; Chiara, Biol Blood Marrow Transplant 2014). En este sentido, resulta una práctica habitual hacer ajustes de los regímenes de acondicionamiento en función de la edad sin pautas claras (Jaglowsky, Biol Blood Marrow Transplant 2014; Saad, Biol Blood Marrow Transplant 2014), así como considerar no candidatos para trasplante a ciertos pacientes sólo por su edad cronológica.

El peor pronóstico para los pacientes de sexo masculino fue descrito para pacientes trasplantados por MM y linfomas por diferentes grupos (Alegre, Bone Marrow Transplant 1998; Kako, Am J Hematol 2015; Smeland, Br J Haematol 2016). No queda claro qué le otorga valor independiente de peor pronóstico, pudiendo estar mediado por otras comorbilidades no evaluadas en el HCT-CI, o por una mayor prevalencia de factores de riesgo como el tabaquismo o la HTA (Karam, PlosOne 2015).

De acuerdo con publicaciones previas, el *status* de la enfermedad al igual que las líneas de quimioterapia pre-trasplante, dos variables intrínsecamente relacionadas a la biología de la patología de base, no resultaron factores de riesgo independientes para la MLE (Satwani, Bone Marrow Transplant 2015). La mayoría de los estudios vinculan estas variables con el riesgo de recaída y la SLE luego del trasplante autólogo.

Ciertos factores extrínsecos significaron un peor resultado en esta experiencia, destacándose el uso del acondicionamiento con BendaEAM (combina bendamustina con etopósido, citarabina y melfalán). Este esquema, descrito por Visani y col., demostró un perfil seguro en un estudio de fase I/II (Visani, Blood 2011). Si bien el

presente estudio no fue diseñado para evaluar la toxicidad de los acondicionamientos, la combinación BendaEAM triplicó el riesgo de mortalidad temprana en relación a otros regímenes como BEAM (carmustina, etopósido, citarabina, melfalán) (Zauch, Leuk Lymphoma 2008) o CBV (carmustina, etopósido, ciclofosfamida), en consonancia con publicaciones recientes (Garciaz, Bone Marrow Transplant 2016).

Las variables anteriormente introducidas fueron reevaluadas en relación a su impacto independiente en la MLE. Con este propósito se amplió la casuística y se homogeneizó la población incluyendo únicamente las dos patologías más frecuentes en trasplante autólogo: MM y linfomas. En esta cohorte de más de 2000 trasplantes, el sexo masculino, el HCT-CI riesgo alto y la edad mantuvieron su valor pronóstico, con un incremento proporcional para los dos últimos grupos etarios analizados (55-64 años y mayores a 64 años). En cuanto a la patología de base, se confirmó el impacto negativo del LNH y, en menor medida, la del LH (Jantunen, Haematologica 2008; Chiara, Biol Blood Marrow Transplant 2014; Saad, Biol Blood Marrow Transplant 2014; Sorrow, Biol Blood Marrow Transplant 2015; Kako, Am J Hematol 2015; Martinez, Ann Hematol 2017).

No hay en la actualidad un *score* que combine las comorbilidades con otras variables clínicas aplicado a trasplante autólogo por diferentes patologías en tamaños poblacionales como el de la presente serie. Los antecedentes se restringen a ciertas patologías y con poblaciones más reducidas (Lerner, Biol Blood Marrow Transplant 2007; Satwani, Bone Marrow Transplant 2015; Graf, Biol Blood Marrow Transplant 2016). Tanto Lerner y col. como Satwani y col. evaluaron la aplicabilidad de sistemas de predicción de riesgo al diagnóstico propios de la patología para predecir la sobrevida post trasplante autólogo en LNH y LH respectivamente. Los autores concluyeron que cada sistema predice la sobrevida libre de enfermedad/progresión. Graf y col. describieron la combinación del HCT-CI con el consumo abusivo de alcohol y la edad en 754 trasplantes autólogos por linfoma. Los autores concluyeron que un *score* combinado de abuso de alcohol, HCT-CI riesgo alto y edad mayor a 50 años se asoció de manera significativa con un incremento de la MLE y una reducción de la SG (Graf, Biol Blood Marrow Transplant 2016).

La construcción de un nuevo sistema de puntuación en nuestra población en función de *hazard ratio* permitió categorizar a los pacientes en 4 grupos de riesgo con un impacto significativo en todos los eventos de morbilidad temprana, así como en la MLE. El incremento del riesgo observado fue cercano al 1% para los pacientes de

riesgo bajo, más de 2 veces para los de riesgo intermedio, 6 veces para los de riesgo alto y casi 15 veces para los de riesgo muy alto. Asimismo, la asociación con la SG a largo plazo fue estadística y clínicamente significativa, mostrando una reducción cercana al 30% para los de riesgo muy alto en comparación con los de riesgo bajo. Esta diferencia encontrada entre los pacientes de menor y los de mayor riesgo es superior al 10% descrito por Sorrow y col. en la validación del HCT-CI para trasplante autólogo (Sorrow, Biol Blood Marrow Transplant 2015).

Por lo tanto, el grupo de riesgo bajo según el nuevo *score* desarrollado, comprendería pacientes jóvenes de sexo femenino con MM como enfermedad de base y con HCT-CI bajo/intermedio. Este grupo de pacientes se asociaría a un bajo riesgo de sufrir eventos de morbilidad temprana con una baja MLE y mejor SG, por lo que podrían resultar candidatos para programas de trasplante autólogo ambulatorio. Mientras que, los pacientes mayores de 64 años de sexo masculino con LNH como enfermedad de base y HCT-CI alto constituirían un grupo con mayor riesgo de sufrir eventos asociados de morbilidad temprana, incrementando la MLE. El nuevo *score* puede ser útil para definir la elegibilidad de los pacientes de alto riesgo para el trasplante, así como titular las dosis del régimen de acondicionamiento.

## **2. Variables clínicas en el trasplante alogénico**

*En la evaluación de los trasplantes alogénicos realizado en la unidad de trasplante hematopoyético del Hospital Universitario Austral, se encontraron factores de riesgo que se asociaron con diferentes eventos clínicos, con especial enfoque en la EICH aguda y crónica, la MLE y la SG. Los más relevantes fueron las comorbilidades y el tipo de donante. A su vez, tras el análisis multicéntrico de pacientes mayores de 50 años se concluye que el procedimiento en centros argentinos tiene resultados similares a los de centros internacionales y que en este subgrupo cobran aún más importancia las comorbilidades.*

La población de trasplantes alogénicos del presente análisis es comparable a las descritas en trabajos retrospectivos de un único centro en cuanto a edad media, sexo de pacientes y donantes, patologías de base (predominio de leucemias agudas y SMD), *status* de enfermedad y prevalencia de donantes relacionado (Sorrow, Blood 2005). La incidencia general de los eventos ocurridos es similar a la series de trabajos de registro (Raiola, Biol Blood Marrow Transplant 2014), con una tasa de EICH aguda clínicamente significativa (G II-IV) de 33% con menos del 15% de las formas severas

(G III-IV), EICH crónica extenso por debajo del 10% a los 3 años, MLE al día 100 del 16% y, alejada, inferior al 30%. Finalmente, la SLE a 3 años fue del 45% y la SG fue superior al 50%.

Una SG alejada del 50% implica que un porcentaje similar falleció. La mortalidad luego de un trasplante alogénico se debe en definitiva a la sumatoria de la mortalidad propia del procedimiento (MLE) y de la enfermedad (luego de la recaída o progresión). La MLE, como evento central de los análisis, puede ocurrir por complicaciones infecciosas, rechazo del injerto, EICH u otros eventos menos frecuentes como síndrome de oclusión sinusoidal, hemorragias o eventos trombóticos (Gooley, NEJM 2010).

A diferencia de lo que sucede en los trasplantes de órganos sólidos en donde la incidencia del rechazo varía desde 10% hasta el 80% según el tipo de trasplante involucrado (Boratynska, Arch Immunol Ther Exp, 2016), en el trasplante hematopoyético alogénico la aparición del verdadero fenómeno de rechazo es muy baja (Kernan, Blood 1989). Esto se debe a que el receptor se encuentra severamente inmunosuprimido por el esquema de acondicionamiento y, también, por las enfermedades neoplásicas y los tratamientos previos. Esta inmunosupresión es de tal magnitud que queda poco margen para que se desarrolle una respuesta inmunológica dirigida contra el injerto (Ciurea, Blood 2011; Cluzeau, Bone Marrow Transplant 2016).

La tasa de rechazo primario del injerto observada menor al 5% concuerda con las series internacionales, al igual que su elevada tasa de mortalidad (Chewning, Biol Blood Marrow Transplant 2007). Los factores de riesgo encontrados fueron los que comúnmente se han detallado: la fuente de CPH provenientes de UCU ha sido el factor de riesgo más determinante, con una tasa del 35%, seguido del 7,5% para la utilización de médula ósea con una tasa semejante a la de los regímenes de intensidad reducida (Ferra, Leuk Lymphoma 2015; Kernan, Blood 1989).

Los factores de riesgo para el desarrollo de EICH aguda grados II-IV fueron las neoplasias mieloproliferativas (48%), el uso de regímenes de acondicionamiento mieloablativo (37% vs. 24%) y los donantes NR (45% vs. 26%), sin diferencias significativas en las formas severas (grados III-IV). Más allá del hallazgo diferencial según las patologías, los dos factores más relevantes fueron la intensidad del esquema de acondicionamiento y el tipo de donante, lo que resulta acorde a las publicaciones previas (Couriel, Cancer 2004; Martin, Blood 2017). Los regímenes mieloablativos generan un daño tisular considerable, sobre todo en el tubo digestivo, aumentando la

presentación de antígenos en este tejido y, a su vez, disparando una situación llamada “tormenta de citoquinas” (Melenhorst, *Haematologica* 2012; Chang, *Biol Blood Marrow Transplant* 2014). Este aumento de las citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-1) genera mayor activación de los linfocitos del donante y, por ende, un incremento del EICH aguda (Hill, *Blood* 2000; Couriel, *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; Teshima, *Biol Blood Marrow Transplant* 2016). Por otro lado, si bien la mayoría de los donantes no emparentados han sido histoidénticos en los genes HLA –A, -B, -C, -DR y –DQ, la disparidad en otros *loci* mayores o en los antígenos menores de histocompatibilidad genera una reacción inmunogenética que gatilla el evento de EICH (Petersdorf, *Tissue Antig* 2003; Kekre, *Am J Hematol* 2016; Martin, *Blood* 2017).

La fuente de progenitores utilizada no influyó en la incidencia de EICH agudo. Sin embargo, la utilización de sangre periférica se asoció con un incremento en la tasa de EICH crónica global. La infusión de CPH de sangre periférica, al incluir un alto contenido de linfocitos maduros, genera una exacerbación de la reacción inmune contra los antígenos dispares y, por consiguiente, de EICH, sobre todo crónica (Bensigner, *Curr Opin Oncol* 2012; Arai, *Biol Blood Marrow Transplant* 2015).

El tipo de donante también influyó en la tasa de EICH crónica global y en sus formas extensas. El uso casi universal de globulina antitímocítica en los donantes NR reduce este evento (Baron, *Haematologica* 2017). Por ende, los trasplantes con donante emparentado, en los cuales el empleo de globulina antitímocítica se limita únicamente a los pacientes con aplasia medular severa, presentaron un incremento en la tasa de EICH crónica global y de sus formas extensas.

La MLE es el indicador clínico de mayor interés y a partir de este parámetro se evaluó el impacto de las variables clínicas sobre la supervivencia global. Si bien no se realizó un estudio comparativo en relación con el tipo de procedimiento, los trasplantes alogénicos presentan una tasa de MLE superior a los trasplante autólogos (16% al día 100, 27% a 3 años vs. 3% al día 100 y 5% a los 3 años), de acuerdo a publicaciones previas (Suci, *Blood* 2003; Wingard, *J Clin Oncol* 2011; Saad, *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; Sorrow *Biol Blood Marrow Transplant* 2015).

En relación con los factores de riesgo asociados a la MLE, al igual que luego del trasplante autólogo, las comorbilidades fueron determinantes para la MLE post trasplante alogénico. Los pacientes con HCT-CI de riesgo intermedio/alto triplicaron su mortalidad comparado con los de riesgo bajo, manteniéndose esta variable como el factor más influyente. Esta situación se tradujo en una reducción de, aproximadamente,

un 40% de la SG para los pacientes de riesgo intermedio/alto, similar a lo expuesto en la literatura (Sorrer, Blood 2005; Sorror, Biol Blood Marrow Transplant 2015).

En el análisis univariado, se observó un claro incremento de la MLE para los pacientes mayores de 50 años comparados con los otros tres grupos etarios que mostraron un comportamiento similar. Sin embargo, y esto merece ser destacado, la edad no demostró ser un factor de riesgo independiente en esta población reducida de un único centro. Este resultado puede estar directamente relacionado al tamaño de la serie ya que numerosas publicaciones describieron el incremento progresivo de la mortalidad en función de la edad del receptor (Gratwohl, Lancet 1998; Gratwohl, Best Pract Res Clin Haematol 2007; Deeg, Blood 2010, Nivison-Smith, Inter Med J 2011; Pidala, Blood 2014).

El otro factor de riesgo para los eventos de sobrevida fue el *status* de la enfermedad (Barret, Expert Rev Hematol, 2010). Los pacientes trasplantados en estadios avanzados presentaron un incremento de la tasa de recaída, sosteniéndose como el único factor de riesgo independiente al evaluar esta complicación. Sin cambios significativos sobre la MLE, los pacientes con estadios avanzados tuvieron una disminución cercana al 40% tanto de la SLE como de la SG independiente de la patología de base. Las patologías benignas, o no oncológica, mostraron mejores resultados a largo plazo sin valor independiente en los análisis multivariados. Las patologías oncohematológicas y, en especial, aquellas que demuestran refractariedad al tratamiento generan un desafío terapéutico. En una fracción importante de este grupo de mal pronóstico la combinación del efecto antitumoral del régimen de acondicionamiento y del injerto *vs.* malignidad no logran erradicar la enfermedad. En estos casos se ha considerado la necesidad de un tratamiento de mantenimiento para evitar la recaída (DeFilipp, Biol Blood Marrow Transplant 2016).

Dentro de los factores propios del donante, el parentesco con el receptor fue la única variable con valor pronóstico independiente. De acuerdo a lo descrito previamente (Woolfrey, Biol Blood Marrow Transplant 2010; Alousi, Blood 2013), el uso de donante NR incrementó el riesgo de MLE más de 2,5 veces. El efecto deletéreo en la MLE se tradujo en una reducción significativa tanto de la SLE como de la SG, con una reducción cercana al 20% para ambos eventos a 3 años. Este hallazgo fue independiente de otras variables como el *status* de la enfermedad al momento del trasplante o la patología de base. Es importante destacar este resultado ya que, en su

mayoría, los trasplantes no emparentados de esta serie fueron realizados en un estadio tardío de la enfermedad, al igual que en series internacionales (Alousi, Blood 2013).

Ciertas variables como la edad del donante, el tipo de acondicionamiento y la serología para CMV no afectaron de manera independiente el desarrollo del trasplante en la presente serie, posiblemente debido al tamaño muestral. Aunque el uso de donantes mayores a 30 años de edad resultó en una reducción de la SLE, no se sostuvo como factor de riesgo en el análisis multivariado. El efecto de la edad del donante ha sido de particular interés en trabajos de registros internacionales, destacándose como uno de los parámetros más relevantes en la selección de donantes NR (Shaw, Biol Blood Marrow Transplant 2018). De un modo similar, la serología pre-trasplante para CMV, un factor relevante en publicaciones previas (Shaw, Biol Blood Marrow Transplant 2017), no fue determinante en esta serie. Este hallazgo podría deberse al número de pacientes incluidos o a la alta prevalencia de serología positiva para CMV en la presente cohorte (85%). Este valor refleja la elevada seropositividad de la población argentina en comparación con otras series internacionales (por debajo del 40%) (Shaw, Biol Blood Marrow Transplant 2017).

El uso de regímenes de intensidad reducida implicó una disminución en la SLE y la SG en el análisis univariado, sin valor independiente. Este tipo de acondicionamiento es habitualmente empleado en los pacientes mayores o con comorbilidades, posiblemente sesgando su independencia como factor de riesgo (Baron, J Clin Oncol 2005; Estey, Blood 2007; Koreth, Biol Blood Marrow Transplant 2010; Koreth, J Clin Oncol 2013). Si bien existe cierta controversia al respecto, los regímenes mieloablativos en patología de alto riesgo serían el estándar de tratamiento. Un estudio reciente prospectivo aleatorizado comparó acondicionamientos mieloablativos *vs.* RIC en pacientes con LMA y SMD, con recuento de blastos en médula ósea menor al 5% y HCT-CI bajo. A pesar de un ligero aumento en la MLE, a causa de una reducción en la recaída, el uso de acondicionamientos mieloablativos se asoció con un beneficio en la SG (Scott, J Clin Oncol 2017). A su vez, podría resultar útil la medición de la enfermedad mínima residual previo al trasplante para identificar aquellos pacientes que se beneficiarían de una régimen más intensivo (Festuccia, Biol Blood Marrow Transplant 2016).

Debido a las limitaciones del tamaño poblacional de los pacientes mayores de 50 años de la serie inicial, se realizó un trabajo multicéntrico incrementando su número. Los resultados de la cohorte para el período comprendido en el análisis fueron



comparables con los de otros países (Alyea, Blood 2005; Aoudjhane, Leukemia 2005; Shimoni, Leukemia 2005; Schetlig, J Clin Oncol 2008; Sorrow, Jama 2011). Se evidenció un 40% de incidencia de EICH aguda (sólo 7% de incidencia de las formas severas), una tasa de MLE de 36% a 1 año y por debajo del 45% a 3 años, resultando en una SG a largo plazo del 20%.

Los factores de riesgo habituales para EICH aguda y crónica como la intensidad del régimen y el uso de donante NR (Alouisi, Blood 2013), no se tradujeron en un incremento en su tasa de aparición en la presente cohorte. Posiblemente sea debido al bajo número de pacientes con donante NR (17%) y al uso de acondicionamientos mieloablativos (24%).

En numerosos trabajos de pacientes mayores, los acondicionamientos mieloablativos se han asociado a mayor riesgo de MLE, con incidencias de hasta 50% vs. 32% (Alyea, Blood 2005). Por esta razón, los acondicionamientos de intensidad reducida, al igual que en esta serie, son elegidos en la mayoría de los centros para los trasplantes en este grupo etario (Baron, J Clin Oncol 2005; Estey, Blood 2007; Koreth, Biol Blood Marrow Transplant 2010 y J Clin Oncol 2013).

La presencia de comorbilidades, evaluadas según el HCT-CI, se sostuvo como uno de los factores determinantes del riesgo de MLE junto con el sexo del paciente. Takasaki y col. validaron este *score* en una población similar a la presente serie describiendo una MLE del 21% a 2 años para los pacientes de riesgo intermedio y del 40% para los de riesgo alto (Takasaki, Int J Hematol 2012). Teniendo en consideración que otros autores han intentado flexibilizar el *score* para una mejor aplicabilidad (Barba, Biol Blood Marrow Transplant 2010; Nakaya, Biol Blood Marrow Transplant 2014) para el análisis univariado se utilizó un punto de corte diferente al original (Sorrow, Blood 2005). Tomando como referencia los pacientes con un *score* de 0, el riesgo de MLE se vio significativamente incrementado para los pacientes con *score* de 1 y todavía más para aquellos con un *score*  $\geq 2$ . El HCT-CI demostró ser un factor de riesgo independiente para la MLE, con riesgo mayor a 2 veces para los pacientes con *score* intermedio/alto en comparación con los de *score* bajo. Además, los pacientes de riesgo intermedio/alto presentaron una SG a 3 años cercana a la mitad de la alcanzada por los pacientes de riesgo bajo, aunque sin mantener su valor independiente.

Al igual que en los trasplantes autólogos, el sexo masculino fue el otro factor de riesgo independiente de las comorbilidades con un incremento de 2,3 veces para la MLE, similar a los hallazgos del Instituto Dana Farber (Armand, Blood 2012). A las

características inherentes al sexo masculino, discutidas previamente en cuanto al mayor riesgo de MLE post trasplante autólogo, en el escenario de trasplante alogénico se sumaría el efecto del sexo del donante producto de la incompatibilidad del cromosoma Y. Según lo descrito por Kim y col., los receptores de sexo masculino, al recibir un trasplante de donante femenino tendrían un incremento significativo de la MLE, la EICH crónica y la tasa de recaída, en comparación con los que reciben un donante de su mismo sexo. Mientras que, en las pacientes femeninas no habría diferencias en relación al sexo de los donantes (Kim, Haematologica 2016).

En la serie aquí descrita, los pacientes que usaron regímenes de inmunosupresión a base de tacrolimus mostraron un mejor resultado en comparación con los que emplearon ciclosporina, fundamentalmente a partir de una reducción en la MLE. Este hallazgo es de interés frente al hecho de otras experiencias donde los resultados no fueron concluyentes, incluido un metanálisis (Ratanatharthorn, Blood 1998; Horowitz, Biol Blood Marrow Transplant 1999; Nash, Blood 2000; Hiraoka, Bone Marrow Transplant 2001; Yanada, Bone Marrow Transplant 2004; Ram, Bone Marrow Transplant 2009; Inamoto, Biol Blood Marrow Transplant 2011; Nasu, Ann Hematol 2014).

Llamativamente, en la presente serie los pacientes mayores de 60 años tuvieron un incremento en la SG en el análisis univariado que no se sostuvo como factor independiente. Otros autores encontraron resultados similares en términos de MLE y SG entre los grupos etarios de 50-65 y los mayores de 65 años (Koreth, Biol Blood Marrow Transplant 2010; Sorrow, JAMA 2011). Esta observación podría estar directamente relacionada con una fuerte selección de los pacientes con un HCT-CI de bajo riesgo, el uso casi universal de RIC y de donantes emparentados, excluyendo aquellos que *a priori* se consideran no candidatos. La falta de independencia de otras características inherentes al paciente, como la presencia de comorbilidades y su sexo, subraya el hecho de que la edad cronológica del paciente no es el factor de riesgo más influyente (Koreth, Biol Blood Marrow Transplant 2010; Sorrow, JAMA 2011).

Las comorbilidades representan un desafío particular para mantener el delicado equilibrio entre el riesgo de recaída/progresión de la enfermedad de base y la morbimortalidad asociada al procedimiento. En los casos de pacientes con enfermedades de alto riesgo, si se decide por el camino del trasplante, se intentará minimizar sus complicaciones con una reducción de la intensidad del régimen o la mejor selección del donante posible y de la fuente de CPH.

# **CAPÍTULO 2**

## **EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE LOS POLIMORFISMOS FUNCIONALES DEL GEN DE *TGFB1* EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO**

## **1. Polimorfismos del gen de *TGFBI* y trasplante alogénico relacionado**

El objetivo de este apartado es el de evaluar la posible asociación entre los polimorfismos funcionales +29 y +74 del gen *TGFBI* con los eventos clínicos ocurridos luego de trasplante alogénico relacionado. Se analizaron 245 pacientes y sus respectivos donantes sometidos a trasplante alogénico relacionado histoidéntico. Las características principales de la población se encuentran detallados en la tabla 26.

Tabla 26. Características de la Cohorte (N 245)		N (%)
Edad pacientes (media 32 años)	< 50 años	201 (82)
	≥ 50 años	44 (18)
Edad donantes (media 34 años)	< 30 años	64 (37)
	≥ 30 años	111 (63)
	Faltantes	70
Sexo pacientes	Masculino	144 (59)
	Femenino	101 (41)
Sexo donantes	Masculino	140 (58)
	Femenino	100 (42)
Enfermedad de base	Leucemia Mieloide Aguda	68 (28)
	Leucemia Linfoblástica Aguda	57 (23)
	Síndrome Mielodisplásico	31 (13)
	Linfoproliferativos	30 (12)
	Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas	22 (9)
	Otros*	37 (15)
<i>Status</i>	Temprano	93 (44)
	Tardío	119 (56)
	Faltante	33
Riesgo según HCT-CI	Bajo	78 (56)
	Intermedio	49 (35)
	Alto	12 (9)
	Dato faltante	106
Acondicionamiento	Mieloablativo	156 (64)
	Intensidad Reducida	89 (36)
Acondicionamiento, II	Busulfán-Ciclofosfamida	79 (33)
	Irradiación Corporal Total-Ciclofosfamida	56 (23)
	Fludarabina + (Intensidad Reducida)	67 (29)
	Timoglobulina-Ciclofosfamida	11 (4)
	Otros	32 (11)
Inmunosupresión	Tacrolimus + Metotrexate	132 (54)
	Ciclosporina + Metotrexate	42 (18)
	Otros	49 (25)
	Ninguna	7 (3)
Fuente progenitores	Sangre Periférica	210 (88)
	Médula Ósea	28 (11)
	Faltante	7

HCT-CI: *score* de comorbilidades pre trasplante. \*Otros incluye patologías malignas (mieloma múltiple) y no malignas (anemia aplásica, fallos medulares congénitos, enfermedad de depósito, inmunodeficiencias).

La SG y la MLE a 5 años de la cohorte completa fue de 51% y 17% respectivamente, la incidencia de recaída de 37% y la SLE de 46%. El 44% manifestó EICH aguda, 31% GII-IV y 10% GIII-IV. El 35% desarrolló EICH crónica, 18%

limitado y 17% extenso. En genotipo +29 se asoció con diversos eventos clínicos analizados. En cambio, el genotipo +74 no mostró resultados significativos en ninguna de las variables clínicas estudiadas (SG, SLE, MLE, recaída, EICH aguda ni crónica), por lo tanto, los detalles fueron omitidos.

### 1.1. Análisis de los polimorfismos

Del total de 245 trasplantes analizados, debido a dificultades técnicas, primordialmente mala calidad del ADN, no se logró genotipificar 9 pacientes y 19 donantes para la posición +29 y 5 pacientes y 6 donantes para la +74.. La frecuencia de presentación de los genotipos correspondientes al SNP +29 C>T de los pacientes fue: TT 23% (55), TC 54% (128) y CC 23% (53), y para donantes 25% (56), 53% (124) y 20% (46), respectivamente. Con respecto al SNP +74, fueron GG 89% (213) y GC/CC 11% (27) en los receptores, y 93% (212) y 7% (17) en los donantes, respectivamente (tabla 27). Las frecuencias genotípicas observadas en la población estudiada se encuentran en equilibrio según la ley de Hardy-Weinberg, tanto en pacientes como en los donantes en las posiciones +29 y +74 (tabla 28).

Genotipo +29	Pacientes N (%)	Donantes N (%)
TT	55 (23)	56 (25)
TC	128 (54)	124 (55)
CC	53 (23)	46 (20)
<i>Alelo</i>		
T	183 (0,50)	180 (0,52)
C	181 (0,50)	170 (0,48)
Genotipo +74	Pacientes N (%)	Donantes N (%)
GG	213 (89)	212 (93)
GC	27 (11)	17 (7)
CC	- (0)	- (0)
<i>Alelo</i>		
G	240 (0,95)	229 (0,96)
C	27 (0,05)	17 (0,04)

Tabla 28. Equilibrio de Hardy-Weinberg: SNP +29 y +74 para pacientes y donantes

		Esperada	Observada	P (Prueba de Chi <sup>2</sup> )
Paciente +29	TT	61	55	0,454
	TC	115	128	0,312
	CC	56	53	0,526
Paciente +74	GG	211	213	0,973
	GC	26	27	0,909
	CC	1	-	0,560
Donante +29	TT	61	56	0,534
	TC	110	124	0,240
	CC	52	46	0,447
Donante +74	GG	210	212	0,616
	GC	18	17	0,870
	CC	2	-	0,562

El genotipo con alelos C en ambos *loci* (+29 y +74) en los pacientes fue del 11,3% (27 pacientes). Según la fórmula de Maynard (Maynard, 1998), el cálculo de desequilibrio de ligamiento (D') es de 0,08. Ambos se encuentran cercanos al equilibrio perfecto y muestran una asociación aleatoria entre ambos, a pesar de su cercanía.

## 1.2. Cohorte completa

### 1.2.1. Enfermedad injerto contra huésped

El genotipo +29 tanto de pacientes como donantes no mostró ninguna asociación significativa con estos eventos, únicamente encontrándose una tendencia a menor EICHa GIII-IV para receptores de donantes TT (tabla 29).

**Tabla 29.** Incidencia de EICH aguda según el genotipo +29 en pacientes y donantes

	EICH aguda (%)	P (univ)	MV OR (IC 95%)	G II-IV (%)	P (univ)	MV OR (IC 95%)	G III-IV (%)	P (univ)	MV OR (IC 95%)
<i>Paciente</i>									
p CC	42	0,299*	Ns	33	0,301*	Ns	16	0,261*	Ns
p TC	41			27			8		
p TT	53			38			10		
p CC	42	0,753¶	Ns	32	0,736¶	Ns	16	0,107¶	Ns
p TC-TT	45			30			8		
p TT	53	0,158¶	Ns	28	0,185¶	Ns	12	1,000¶	Ns
P TC-CC	42			28			9		
<i>Donante</i>									
d CC	35	0,317*	Ns	24	0,367*	Ns	9	0,074*	Ns
d TC	46			32			13		
d TT	49			37			2		
d CC	35	0,182¶	Ns	24	0,285¶	Ns	9	1,000¶	Ns
d TC-TT	43			33			10		
d TT	49	0,433¶	Ns	37	0,318¶	Ns	2	0,052¶	Ns
d TC-CC	43			29			12		

EICH: enfermedad injerto contra huésped; p: paciente; d: donante; OR: *Odds Ratio*; IC: intervalo de confianza; Ns: no significativa. Univ, univariado: \* Prueba Chi<sup>2</sup>; ¶ Prueba exacta de Fisher; MV: multivariado: Regresión logística

El genotipo del paciente no influyó en la incidencia de EICH crónica ni de sus formas extensas. En relación al genotipo de los donantes, aquellos pacientes que recibieron un trasplante de donante CC tuvieron un incremento significativo de la EICH crónica (CC 50% vs. TC/TT 33%, p=0,039, exacta de Fisher) y de sus formas extensas (CC 35% vs. TC/TT 15%, p=0,005, exacta de Fisher).

### 1.2.2. Análisis de sobrevida

El genotipo +29 de los pacientes al igual que el de los donantes no estuvieron asociados de manera significativa con los eventos de sobrevida: MLE, recaída, SG, SLE (figura 33 A y B).

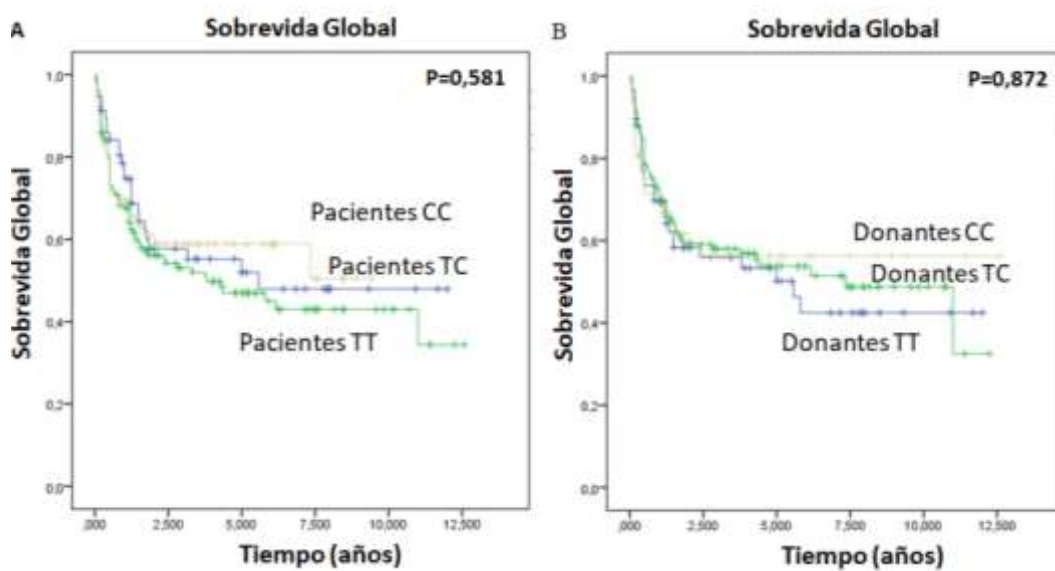


Figura 33. Curvas según Kaplan-Meier de sobrevida global en la cohorte completa de pacientes con trasplante alogénico relacionado en función del genotipo +29 de los pacientes (A) y donantes (B).

### 1.3. Sub-análisis trasplantes mieloablativos

#### 1.3.1. Descripción de la población

La cohorte mieloablativa mostró una SG y MLE a 5 años de 56% y 15% respectivamente, una tasa de recaída de 33% y una SLE de 52%. En este subgrupo el 49% de los pacientes desarrolló EICH aguda, GII-IV 38% y GIII-IV 10%. El 40% de los pacientes desarrolló EICH crónica, 21% limitado y 19% extenso.

#### 1.3.2. Enfermedad injerto contra huésped aguda

Los pacientes +29 TT tuvieron mayor incidencia de EICH aguda (TT 67% vs. TC/CC 45%,  $p=0,020$ , exacta de Fisher), significativo tras el análisis multivariado (OR 5,6, IC 95% 1,10-30,12) y los GII-IV (48% vs. 35%; OR 5,5, IC 95% 1,10-27,34), sin influir en las formas severas (GIII-IV). Estas manifestaciones severas se incrementaron significativamente en los pacientes +29 CC (GIII-IV 22% vs. 7,2%,  $p=0,015$ , exacta de Fisher) aunque este efecto no se mantuvo luego del análisis multivariado (tabla 30). Con respecto al genotipo de los donantes, se encontró una tendencia a mayor incidencia de EICH aguda en los pacientes que recibieron un trasplante de un donante +29 TT (62%

vs. 44%, p=0,070, exacta de Fisher) sin diferencias significativas en la incidencia de las formas graves (tabla 30).

**Tabla 30.** Incidencia de EICH aguda según el genotipo +29 en pacientes y donantes en la cohorte mieloablativa

	EICHa (%)	P (univ)	MV OR (IC 95%)	G II- IV (%)	P (univ)	MV OR (IC 95%)	G III- IV (%)	P (univ)	MV OR (IC 95%)
<i>Genotipo del paciente</i>									
p CC	53	0,045*	Ns	47	0,100*	Ns	22	0,030*	Ns
p TC	41			30			5		
p TT	67			48			12		
p CC	53	0,655¶	Ns	47	0,241¶	Ns	22	0,010¶	Ns
p TC-TT	49			35			7		
p TT	67	0,020¶	5,6 (1,1-30)	48	0,166¶	5,5 (1,1-27)	12	0,745¶	Ns
P TC-CC	45			35			10		
<i>Genotipo del donante</i>									
d CC	43	0,211*	Ns	35	0,255*	Ns	13	0,311*	Ns
d TC	45			33			12		
d TT	62			50			3		
d CC	43	0,515¶	Ns	33	0,555¶	Ns	13	0,511¶	Ns
d TC-TT	50			39			9		
d TT	62	0,075¶	Ns	50	0,095¶	Ns	3	0,165¶	Ns
d TC-CC	44			34			12		

EICHa: enfermedad injerto contra huésped aguda; p: paciente; d: donante. OR: *Odds Ratio*; IC: intervalo de confianza; Ns: no significativa. Univ: univariado: \* Prueba Chi<sup>2</sup>, ¶ Prueba exacta de Fisher, MV: multivariado: regresión logística

En relación con la EICH crónica, el genotipo del receptor no mostró diferencias significativas en este evento. Sin embargo, los receptores de donante +29 CC presentaron un incremento significativo en la incidencia del EICH crónica extenso (32% vs. 16%; OR 9,0, IC 95% 1,30-62,61; p=0,020, regresión logística) (tabla 31).

**Tabla 31.** Incidencia de EICH crónica dependiendo del SNP +29 en la cohorte mieloablativa

	EICH crónico (%)	P (univ)	Multivariado OR (IC 95%)	EICH crónica Extenso (%)	P (univ)	Multivariado OR (IC 95%)
<i>Genotipo del paciente</i>						
p CC	44	0,715*	Ns	22	0,444*	Ns
p TC	38			16		
p TT	45			26		
p CC	44	0,699¶	Ns	22	0,675¶	Ns
p TC-TT	40			18		
p TT	45	0,565¶	Ns	26	0,305¶	Ns
P TC-CC	39			17		
<i>Genotipo del donante</i>						
d CC	55	0,188*	Ns	32	0,010*	Ns
d TC	36			12		
d TT	39			29		
d CC	55	0,075¶	Ns	32	0,050¶	9,0 (1,3-62)
d TC-TT	37			16		
d TT	39	0,795¶	Ns	29	0,155¶	Ns
d TC-CC	41			17		

EICH: enfermedad injerto contra huésped; p: paciente; d: donante. Univ: univariado: \* Prueba Chi<sup>2</sup>, ¶ Prueba exacta de Fisher, multivariado: regresión logística. OD: *Odds Ratio*; IC, intervalo de confianza; Ns: no significativa



### 1.3.3. Análisis de sobrevida

Los pacientes +29 CC presentaron un aumento significativo de la MLE al día 100 (CC 19% vs. TC/TT 7%) al igual que a largo plazo (1-5 años CC 28-32% vs. TC/TT 7-10%,  $p=0,004$ , prueba de Gray) (figura 34 A). Tras el análisis multivariado incluyendo el *score* HCT-CI, la edad, patología de base y *status*, este genotipo fue el único factor que conservó su valor pronóstico (HR 4,2, IC 95% 1,2-15,2, regresión de Cox) (tabla 32).

No hubo diferencias significativas en la SG en función del SNP +29 (1-3 años CC 57-52% vs. TC/TT 77-65%,  $p=0,155$ , prueba de log-rank) (figura 34 B). Al analizar las diferentes causas de mortalidad, los pacientes +29 CC tuvieron un incremento significativo en la mortalidad por síndrome de oclusión sinusoidal (18% vs. 0%,  $p=0,010$ , exacta de Fisher) sin diferencias en la mortalidad por infecciones (12% vs. 17%,  $p=0,485$ , exacta de Fisher).

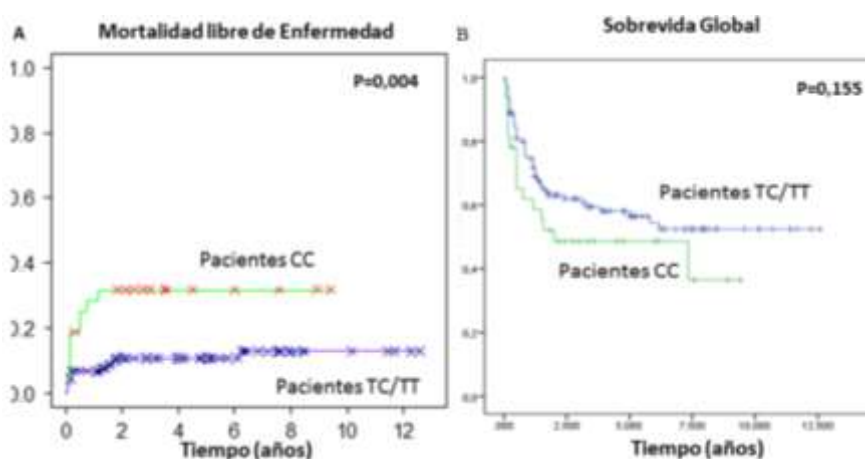


Figura 34. Curvas de incidencia acumulada de mortalidad libre de enfermedad (A) y sobrevida global (B) en trasplantes mieloablativos en función del SNP +29 de los pacientes

Tabla 32. Análisis multivariado de mortalidad libre de enfermedad

	P	Hazard Ratio	IC 95%	
			Inferior	Superior
Pacientes pediátricos	0,866	0,81	0,09	7,19
Leucemias Agudas	0,215	2,52	0,58	10,91
HCT-CI Riesgo Intermedio/Alto	0,475	1,51	0,49	4,68
Acondicionamiento ICT	0,366	1,64	0,56	4,77
Estadios avanzados	0,766	1,19	0,37	3,78
Pacientes +29 CC	0,020	4,22	1,17	15,21

HCT-CI: *score* de comorbilidades; ICT: irradiación corporal total; IC: intervalo de confianza.  
Regresión Cox

Los receptores de donante +29 TT presentaron un incremento significativo en la recaída (1-5 años TT 37-51% vs. TC 19-25% vs. CC 13-19%,  $p=0,020$ , prueba de Gray)

(figura 35 A), sin diferencias en la MLE (1-5 años TT 7-11% vs. TC 10-13% vs. CC 16-16%,  $p=0,755$ , prueba de Gray) (figura 35 B). Además, estos pacientes mostraron una tendencia a menor SLE (1-5 años TT 57-36% vs. TC/CC 73-63%,  $p=0,050$ , prueba de log-rank) (figura 36 A) y una reducción significativa en la SG (1-5 años TT 69-50% vs. TC/CC 77-69%,  $p=0,045$ , prueba de log-rank) (figura 36 B).

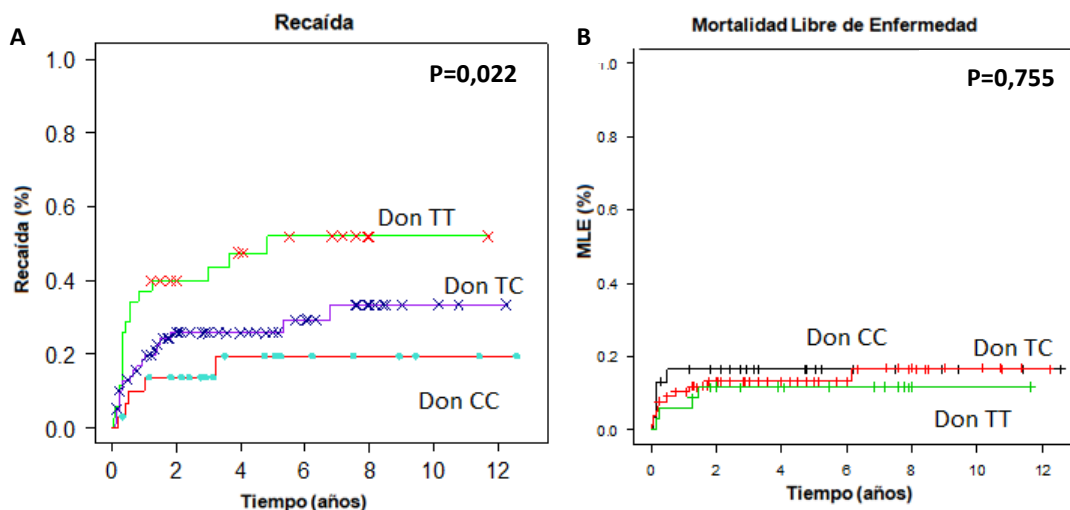


Figura 35. Curvas de incidencia acumulada de la tasa de recaída (A) y mortalidad libre de enfermedad (B) en la cohorte mieloablatoivo relacionado en función del SNP +29 de los donantes. Don: donantes.

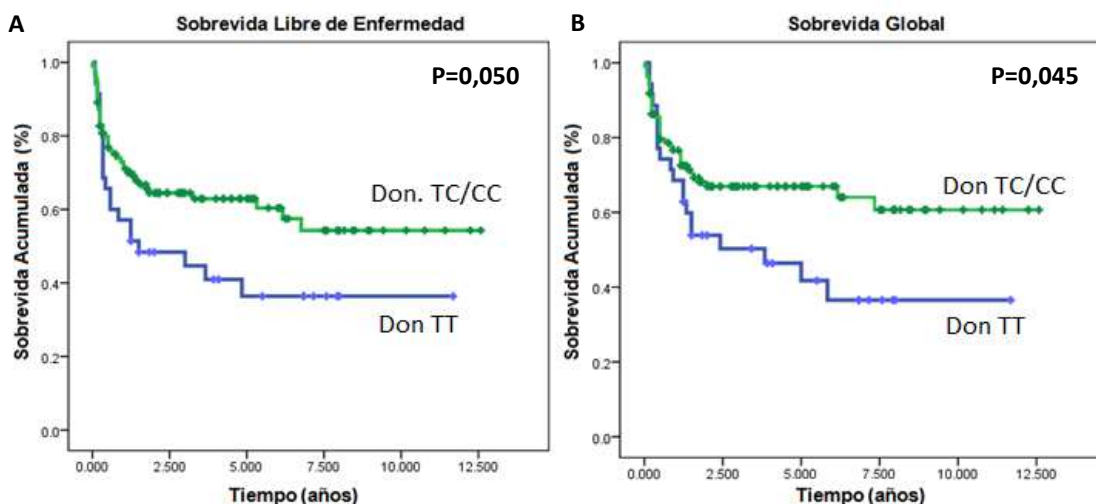


Figura 36. Curvas de según Kaplan-Meier de la sobrevida libre de enfermedad (A) y la sobrevida global (B) en la cohorte mieloablatoivo relacionado en función del SNP +29 de los donantes. Don: donantes.

Tras el análisis multivariado, el genotipo de los donantes mantuvo su independencia como factor de riesgo para recaída incluyendo el *status* pre-trasplante la patología de base y el uso de ICT (HR 2,4, IC 95% 1,21-4,94,  $p=0,010$ , regresión de Cox) (tabla 33). A su vez, para SLE y SG el genotipo +29 de los donantes se encontró en el límite de la significancia (SLE. HR 2,5, IC 95% 0,97-6,57  $p=0,050$ , regresión de Cox) (tabla 34) (SG: HR 1,9, IC 95% 0,99-3,80  $p=0,050$ , regresión de Cox) (tabla 35).

Tabla 33. Análisis multivariado de recaída

	<i>P</i>	<i>Hazard Ratio</i>	<i>IC 95%</i>	
			Inferior	Superior
Pacientes adultos	0,050	6,99	0,93	52,3
Leucemia Linfoblástica Aguda	0,030	2,70	1,08	6,35
Estadios avanzados	0,505	1,25	0,65	2,40
Acondicionamiento ICT	0,866	0,91	0,34	2,42
Donantes +29 TT	0,010	2,45	1,21	4,94

ICT: irradiación corporal total. IC: intervalo de confianza. Regresión según Cox

Tabla 34. Análisis multivariado de sobrevida libre de enfermedad

	<i>P</i>	<i>Hazard Ratio</i>	<i>IC 95%</i>	
			Inferior	Superior
Pacientes adultos	0,333	2,06	0,47	8,94
Leucemia Linfoblástica Aguda	0,585	1,41	0,41	4,82
Estadios avanzados	0,333	1,43	0,68	2,98
Acondicionamiento ICT	0,445	1,61	0,46	5,56
Citomegalovirus del paciente	0,211	3,52	0,47	26,2
Pacientes +29 CC	0,435	1,42	0,59	3,41
Donantes +29 TT	0,050	2,52	0,97	6,57

ICT: irradiación corporal total; IC: intervalo de confianza. Regresión según Cox

Tabla 35. Análisis multivariado de sobrevida global

	<i>P</i>	<i>Hazard Ratio</i>	<i>IC 95%</i>	
			Inferior	Superior
Pacientes adultos	0,266	1,97	0,84	6,45
Estadios avanzados	0,175	1,49	0,83	2,69
Acondicionamiento ICT	0,040	1,84	1,01	3,39
Pacientes +29 CC	0,111	1,80	0,87	3,73
Donantes +29 TT	0,050	1,94	0,99	3,80

ICT: irradiación corporal total; IC: intervalo de confianza. Regresión según Cox

## **2. Polimorfismos del gen de *TGFBI* y trasplante alogénico NR**

El objetivo de este apartado es el de evaluar la posible asociación entre los polimorfismos funcionales +29 y +74 del gen *TGFBI* con los eventos clínicos ocurridos luego de trasplante alogénico, relacionado. Las características generales de la población se describen en la tabla 36.

La SG de la cohorte a 5 años fue de 43%, la MLE del 30%, la tasa de recaída de 42%, la SLE del 28%. La incidencia de EICH aguda fue de 49%, EICHa grados II a IV (GII-IV) 25% y grados II y IV (GIII-IV) de 5,5%; mientras que la incidencia de EICH crónica fue de 51%, extenso de 18%. La falla del injerto ocurrió en el 3,5% de los pacientes. En genotipo +29 se asoció con diversos eventos clínicos analizados. En cambios, el genotipo +74 no mostró resultados significativos en ninguna de las variables

clínicas estudiadas (SG, SLE, MLE, recaída, EICH aguda ni crónica), por lo tanto, los detalles fueron omitidos.

Tabla 36. Características de pacientes y donantes (N=686)	N	%
<b>Edad del paciente</b>		
≤40	317	46
>40	369	54
<b>Edad del donante</b>		
<30	207	30
≥30	479	70
<b>Sexo, masculino</b>		
Paciente	430	63
Donante	523	76
<b>Compatibilidad HLA</b>		
HLA 10/10	468	68
HLA 12/12	79	11
<b>Enfermedad</b>		
Leucemia Mieloide Crónica	129	19
Leucemia Mieloblástica Aguda	185	27
Leucemia Linfoblástica Aguda	150	22
Síndromes Mielodisplásicos	62	9
Linfoproliferativos	75	11
Otras enfermedades#	85	12
<b>Status de la enfermedad</b>		
Temprana	300	44
Tardía	308	45
Desconocida	78	11
<b>Fuente de células madre</b>		
Médula ósea	487	71
Sangre Periférica	199	29
<b>Régimen de Acondicionamiento</b>		
Mieloablativo	427	62
Intensidad Reducida	213	31
Dato faltante	46	7
<b>Depleción de células T</b>		
Si	574	84
No	61	9
Desconocido	51	7
<b>Inmunosupresión</b>		
Ciclosporina	273	39
Ciclosporina + Metotrexate	304	44
Otros	18	3
Ninguna	31	5
Desconocida	60	9

#otras enfermedades: incluye malignas (mieloma múltiple, mielofibrosis) y no malignas (anemia aplásica, hemoglobinopatías, inmunodeficiencias, fallos medulares congénitos); HLA 12/12, compatible en 12 de 12 locus incluyendo DPB1.

## 2.1. Análisis de los polimorfismos

Los SNP c.+29 T/C y c.+74 G/C del exón 1 del gen *TGFBI* (notación legada; +29 y +74, respectivamente) fueron estudiados mediante una PCR SSP (ver métodos, capítulo 2) en 686 pares de pacientes-donantes. Los resultados de la PCR SSP fueron validados mediante secuenciación automática en 25 muestras.

La frecuencia de presentación de los genotipos correspondientes al SNP +29 T/C en los pacientes fue TT 37,5% (257), TC 49,7% (341) y CC 12,8% (88); y para donantes fue TT 38,3% (263), TC 50,1% (344) y CC 11,5% (79). Con respecto al SNP +74 G/C, las frecuencias en los pacientes fueron GG 86,4% (593), GC 12,8% (88) y CC 0,7% (5); y para donantes GG 85,1% (584), GC 14,6% (100) y CC 0,3% (2) (tabla 37).

<b>Tabla 37 Frecuencias genotípicas y alélicas</b>		
<b>SNP +29 T/C</b>	<b>Pacientes N (%)</b>	<b>Donantes (%)</b>
<b>Genotipos</b>		
TT	257 (37,5)	263 (38,1)
TC	341 (49,7)	344 (50,1)
CC	88 (12,8)	79 (11,5)
<i>Alelos</i>		
T	855 (0,60)	870 (0,60)
C	517 (0,40)	502 (0,40)
<b>SNP +74 G/C</b>	<b>Pacientes N (%)</b>	<b>Donantes N (%)</b>
<b>Genotipos</b>		
GG	593 (86,4)	584 (85,1)
GC	88 (12,8)	100 (14,3)
CC	5 (0,70)	2 (0,30)
<i>Alelos</i>		
G	1274 (0,90)	1268 (0,90)
C	98 (0,10)	104 (0,10)

Las frecuencias genotípicas observadas se encuentran en equilibrio según la ley de Hardy-Weinberg, tanto en pacientes como en los donantes en las posiciones +29 y +74 (tabla 38). El genotipo con alelos C en ambos *loci* (+29 y +74) en los pacientes fue del 12,8% (88 pacientes). Según la fórmula de Maynard (Maynard, 1998), el cálculo de desequilibrio de ligamiento (D') es de 0,08. Ambos se encuentran cercanos al equilibrio perfecto, mostrando una asociación aleatoria entre ambos.

<b>Tabla 38. Equilibrio de Hardy-Weinberg: SNP +29 y +74</b>				
<b>Frecuencias genotípicas esperadas y observadas para pacientes y donantes</b>				
		<b>Esperada</b>	<b>Observada</b>	<b>P (Prueba Chi<sup>2</sup>)</b>
Paciente +29	TT	260	257	0,966
	TC	322	341	0,304
	CC	96	88	0,526
Paciente +74	GG	589	593	0,979
	GC	89	88	0,894
	CC	3	5	0,484
Donante +29	TT	267	263	0,716
	TC	315	344	0,487
	CC	89	79	0,388
Donante +74	GG	576	584	0,991
	GC	96	100	0,799
	CC	4	2	0,402

## 2.2. Cohorte completa

### 2.2.1. Enfermedad injerto vs. huésped

EL genotipo +29 de los pacientes estuvo fuertemente asociado con la EICHa. Los pacientes +29 CC tuvieron una reducción significativa en la incidencia del EICH aguda, particularmente en los GII-IV, demostrándose ser un factor de riesgo independiente con un HR 2,1 IC 95% 1,1-4,5 (tabla 39). Este efecto se sostuvo en el análisis de los trasplantes histoidénticos (al excluir aquellos trasplantes con algún tipo de incompatibilidad HLA). No se observaron diferencias significativas en la incidencia de EICHa en función del genotipo de los donantes. No se observaron diferencias significativas en la incidencia de EICHc en función del genotipo +29.

**Tabla 39.** Incidencia de EICH aguda según el genotipo +29 en pacientes y donantes

	EICHa (%)	P (univ)	MV OR (IC 95%)	G II-IV (%)	P (univ)	MV OR (IC 95%)	G III-IV (%)	P (univ)	MV OR (IC 95%)
<i>Genotipo del paciente</i>									
p CC	38	0,010*	Ns	14	0,010*	Ns	2	0,345*	Ns
p TC	54			29			5		
p TT	45			23			7		
p TT	45	0,118¶	Ns	23	0,251¶	Ns	7	0,142¶	Ns
p TC-CC	50			26			5		
p TT/TC	50	0,040¶	1,5 (0,9-2,5)	27	0,009¶	2,1 (1,1-4,5)	6	0,178¶	Ns
P CC	38			14			2		
<i>Genotipo del donante</i>									
d CC	46	0,291*	Ns	29	0,566*	Ns	7	0,793*	Ns
d TC	52			26			5		
d TT	46			23			5		
d TT	45	0,109¶	Ns	23	0,193¶	Ns	5	0,544¶	Ns
d TC-CC	51			26			5		
d TT/TC	49	0,373¶	Ns	25	0,280¶	Ns	5	0,328¶	Ns
d CC	46			29			7		

EICHa: enfermedad injerto contra huésped aguda; p: paciente; d: donante. OR: *Odds Ratio*; IC: intervalo de confianza; Ns: no significativa. Univ: univariado: \* Prueba  $\chi^2$ , ¶ Prueba exacta de Fisher, MV: multivariado: regresión logística

### 2.2.2. Análisis de sobrevida

El genotipo +29 no se asoció de manera significativa con los eventos de sobrevida: SG según el SNP +29 de los pacientes (5 años CC 37% vs. TC 39% vs. TT 45%, p=0,155, prueba de log-rank) (figura 37 A) y los donantes (5 años CC 43% vs. TC 40% vs. TT 42%, p=0,633, prueba de log-rank) (figura 37 B); SLE según +29 de los pacientes (5 años CC 22% vs. TC 26% vs. TT 33%, p=0,155, prueba de log-rank) y donantes (5 años CC 32% vs. TC 26% vs. TT 29%, p=0,633, prueba de log-rank). Los genotipos tampoco influyeron significativamente en la recaída ni en la mortalidad libre de enfermedad.

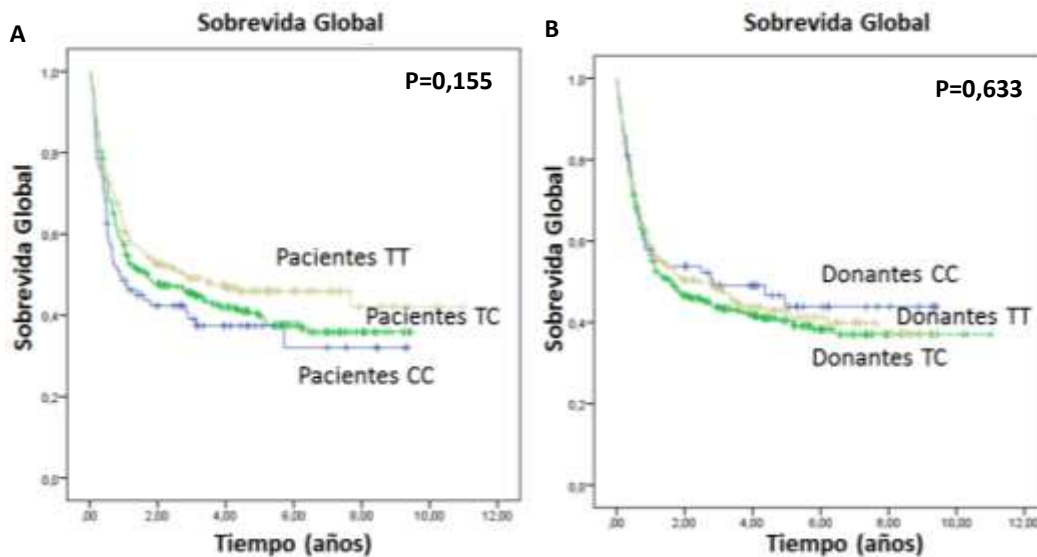


Figura 37. Curvas según Kaplan-Meier de sobrevida global en la cohorte completa de pacientes con trasplante alogénico no relacionado en función del genotipo +29 de los pacientes (A) y donantes (B).

### 2.3. Sub-análisis trasplantes mieloablativos

#### 2.3.1. Descripción de la población

Se realizó un sub-análisis de los pacientes que recibieron acondicionamientos mieloablativos (N 427 pares de paciente-donantes). La sobrevida global a 5 años fue de 41%, la SLE del 27%, la MLE de 32% y la recaída de 41%. Las principales causas de muerte fueron infección (22%), recaída (21%) y EICH aguda (5%).

#### 2.3.2. Enfermedad injerto contra huésped

La incidencia de EICH aguda fue del 54%, grados II-IV (GII-IV) de 29% y grados III-IV (GIII-IV) de 7,3%. El genotipo +29 de los pacientes y de los donantes no influyó en la incidencia de EICH aguda tanto en los trasplantes histoidénticos como con al menos una incompatibilidad (tabla 40).

La incidencia de EICH crónica fue del 48% y de las formas extensas del 17%. No se observó una asociación entre el genotipo +29 en pacientes ni en donantes y la incidencia de ambas manifestaciones.

**Tabla 40** Incidencia de EICH aguda dependiendo del genotipo +29 en pacientes y donantes en la cohorte con acondicionamiento mieloablativo

	EICHa (%)	P	EICHa GII-IV (%)	P	EICHa GIII-IV (%)	P
<i>Cohorte completa</i>						
p TT	51	0,360	28	0,466	10	0,360
p TC	57		32		6	
p CC	48		23		5	
d TT	51	0,522	28	0,906	7	0,986
d TC	57		29		7	
d CC	51		31		8	
<i>Cohorte histoidénticos</i>						
p TT	45	0,353	22	0,353	7	0,796
p TC	53		30		6	
p CC	41		21		3	
d TT	43	0,304	20	0,210	3	0,319
d TC	53		30		8	
d CC	47		30		5	

Abreviaturas: EICHa: enfermedad injerto contra huésped aguda; p: paciente; d: donante. Prueba de  $\chi^2$ .

### 2.3.3. Análisis de sobrevida

La MLE fue el evento clínico más relevante asociado al genotipo +29. Los pacientes homocigotas para el alelo C (CC) tuvieron una mayor MLE comparada con los otros dos grupos combinados (TT-TC) (1 y 3 años 47% y 47% vs. 26% y 29%,  $p=0,010$ , prueba de Gray) (figura 38 A). Al analizar los tres genotipos por separado, se observó una sugerencia de efecto de dosis del alelo C (1 y 3 años para CC 47 y 47% vs. TC 28 y 31% vs. TT 25 y 27%,  $p=0,030$ , prueba de Gray) (Figura 38 B). Entre las causas de muerte, los pacientes +29 CC tuvieron un incremento significativo de la mortalidad por eventos infecciosos (34% vs. 20%,  $p=0,025$ , prueba exacta de Fisher). El genotipo de los donantes no mostró impacto significativo en la MLE.

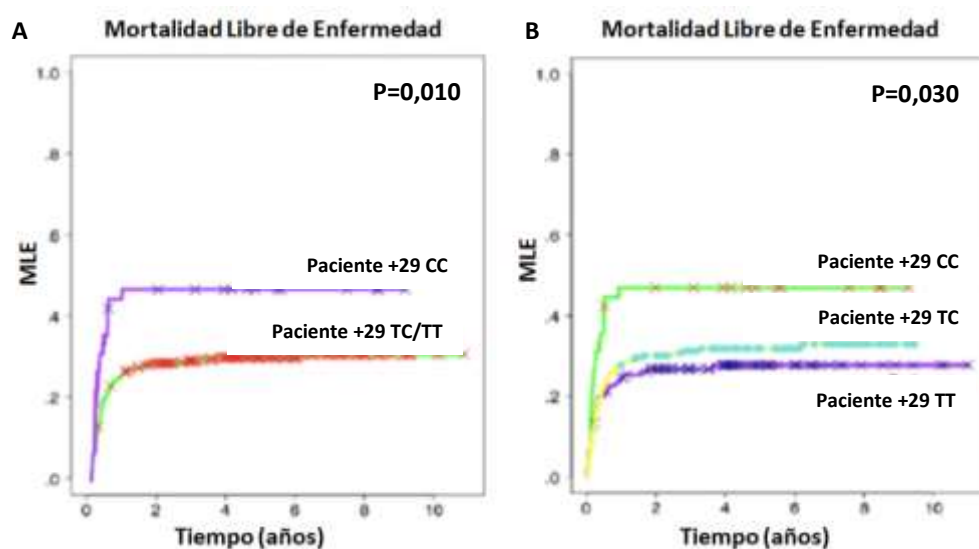


Figura 38. Curvas de incidencia acumulada de mortalidad libre de enfermedad en la cohorte mieloablativa en función del SNP +29 de los pacientes. A: pacientes CC vs. TC/TT.

B: pacientes CC vs. TC vs. TT



El análisis multivariado, incluyendo la edad del paciente y del donante, serología pre-trasplante de citomegalovirus del paciente, depleción de linfocitos T, incompatibilidad HLA y genotipo +29 del paciente, confirmó la influencia negativa independiente del genotipo +29 CC en la MLE, junto con la edad del paciente. Los pacientes +29 CC tuvieron un incremento significativo en la MLE (HR 1,91; IC 95%, 1,23-2,96; p=0,010; regresión según Cox) (tabla 41).

**Tabla 41.** Análisis multivariado para mortalidad libre de enfermedad

	<i>P</i>	<i>Hazard Ratio</i>	<i>IC 95%</i>	
			Inferior	Superior
Paciente +29 CC	0,010	1,91	1,23	2,96
Paciente mayor de 40 años	0,010	1,73	1,19	2,49
Donante mayor de 30 años	0,050	1,45	0,98	2,13
Estado de CMV del paciente	0,285	1,20	0,85	1,71
Depleción de células T	0,345	1,33	0,73	2,41
Incompatibilidad HLA	0,377	1,16	0,82	1,63

CMV: citomegalovirus; HLA: complejo mayor de histocompatibilidad. Regresión de Cox

El genotipo +29 del paciente (5 años CC 31% vs. TC 42% vs. TT 39%, p=0,652, prueba de Gray) y del donante (5 años CC 35% vs. TC 41% vs. TT 39%, p=0,793, prueba de Gray) no influyeron en la recaída. Tampoco se observaron efectos significativos en SLE (pacientes: 5 años CC 21% vs. TC 25% vs. TT 32%, p=0,382, prueba de log-rank) (donantes: 5 años CC 32% vs. TC 27% vs. TT 26%, p=0,891, prueba de log-rank).

El genotipo +29 en los pacientes mostró un impacto significativo en la SG. Los pacientes CC vs. otros (TT-TC) tuvieron una reducción significativa de la SG (2 y 5 años 32% y 29 vs. 49% y 42%, p=0,010, prueba de log-rank) (figura 39 A). En el análisis de sobrevida de acuerdo a los tres genotipos se evidenció un aparente efecto de dosis (2 y 5 años 32% y 29% vs. 47% y 40% vs. 51% y 46% para CC, TC y TT respectivamente, p=0,030, prueba de log-rank) (figura 39 B). El genotipo de los donantes no mostró un impacto significativo en la SG.

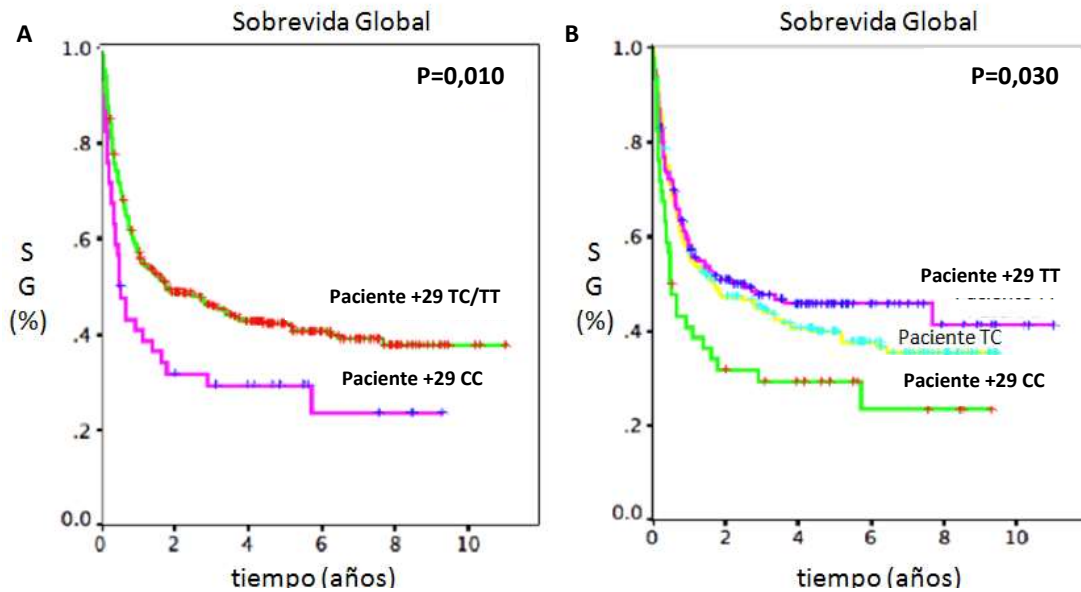


Figura 39. Curvas según Kaplan-Meier de sobrevida global en la cohorte mieloablativa en función del SNP +29 de los pacientes. A: pacientes +29 CC vs. TC/TT. B: pacientes +29 CC vs. TC vs. TT

El análisis multivariado de SG confirmó la independencia de la edad del paciente y del donante, el *status* de la enfermedad y el genotipo +29 de los pacientes como factores de riesgo. Los pacientes CC presentaron una mortalidad 1,5 veces mayor que los pacientes TC/TT (HR: 1,51; IC 95% 1,00-2,28; p=0,045) (tabla 42).

**Tabla 42.** Análisis multivariado de sobrevida global

	P	Hazard Ratio	IC 95%	
			Inferior	Superior
Paciente 10 CC	0,045	1,51	1,00	2,28
Paciente >40 años	0,010	1,64	1,18	2,28
Donante >30 años	0,045	1,38	1,01	1,88
Citomegalovirus del paciente	0,299	1,18	0,86	1,60
Citomegalovirus del donante	0,645	1,08	0,77	1,50
Enfermedad de base				
Otras Enfermedades	ref.			
Leucemia Mieloide Crónica	0,285	0,65	0,30	1,41
Leucemia Mieloide Aguda	0,515	0,77	0,36	1,65
Síndrome Mielodisplásico	0,444	0,70	0,28	1,73
Leucemia Linfoblástica Aguda	0,475	0,75	0,35	1,62
Linfoproliferativos	0,799	0,85	0,27	2,67
Inmunosupresión post trasplante				
Ciclosporina + Metotrexate	ref.			
Ninguna	0,333	1,29	0,76	2,18
Ciclosporina	0,465	1,12	0,82	1,52
Otras	0,235	0,49	0,15	1,56
Incompatibilidad HLA	0,333	1,15	0,86	1,53
<i>Status</i> avanzado de enfermedad	0,010	1,45	1,08	1,95
Depleción de células T	0,255	0,78	0,51	1,19

Abreviaturas: paciente 10 CC, paciente homocigota para el SNP +29; HLA: complejo mayor de histocompatibilidad; ref.: referencia; Regresión de Cox.

### **3. Análisis funcionales de los polimorfismos del gen de *TGFB1***

En los apartados anteriores se comprobó que la presencia del polimorfismo +29 C>T del gen *TGFB1* modifica los resultados, de manera significativa, del trasplante alogénico de CPH, especialmente en aquellos pacientes que recibieron un acondicionamiento mieloablativo. El objetivo de este análisis fue determinar si la presencia del polimorfismo afecta la funcionalidad de la citoquina y, de esta manera, encontrar el fundamento fisiopatológico de los hallazgos anteriores.

#### **3.1. Evaluación de TGFβ1 en el trasplante hematopoyético**

##### **3.1.1. Patrón de activación *in vitro* de los Tregs**

Según lo comentado en métodos (capítulo 2, 2,1-2,3), luego de aislar Tregs y estimularlas, se estudió su perfil de activación mediante citometría de flujo (figura 40). Se observó que la expresión basal de TGF-β1 en los Tregs era menor a 5%. A partir de su estimulación esta expresión aumentaba, alcanzando el pico a las 48h de alrededor del 15%, para luego descender lentamente (figura 41).

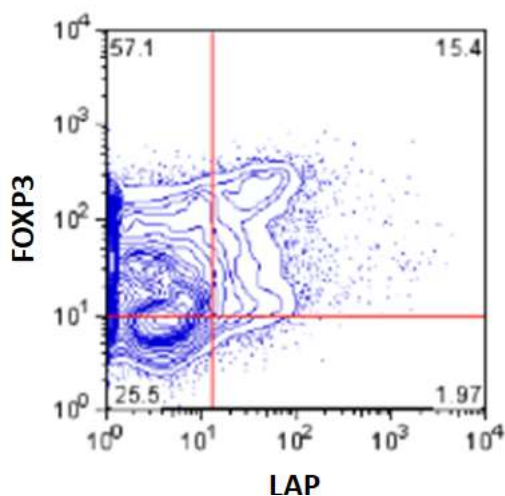


Figura 40 Expresión de TGF-β1 en la membrana de linfocitos T reguladores (doble positivo FOXP3/LAP). LAP: péptido asociado a latencia

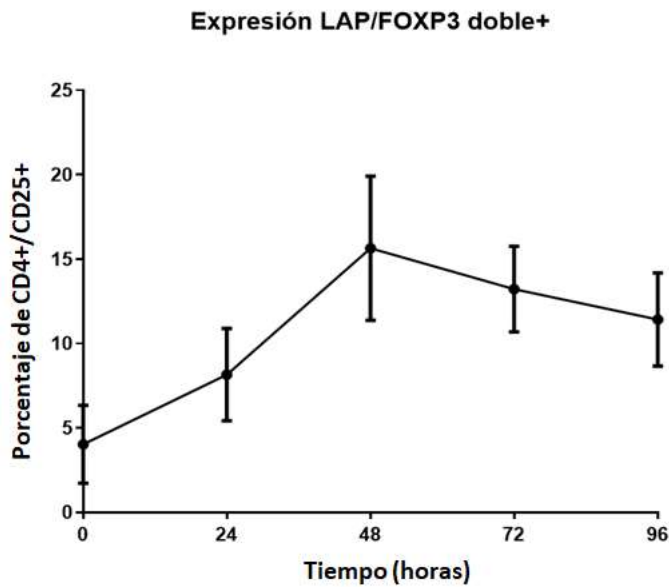


Figura 41. Cinética de expresión de TGF- $\beta$ 1 en los linfocitos T reguladores en función del tiempo de estimulación *in vitro*. LAP: péptido asociado a latencia

### 3.1.2. Patrón de activación *in vivo* de los Tregs

Inicialmente se realizó un análisis de los Tregs (en relación a los CD4 totales) y su presencia en el período peri-trasplante. Los pacientes que recibieron globulina anti linfocitaria, utilizada en la totalidad de los paciente sometidos a un trasplante alogénico NR (10 pacientes) y en los pacientes con aplasia medular como enfermedad de base con donante relacionado (1 paciente), tuvieron una depleción de los CD4/FOXP3 durante el primer mes, reapareciendo en las medicaciones posteriores al día 60 luego de realizado el procedimiento (figura 42).

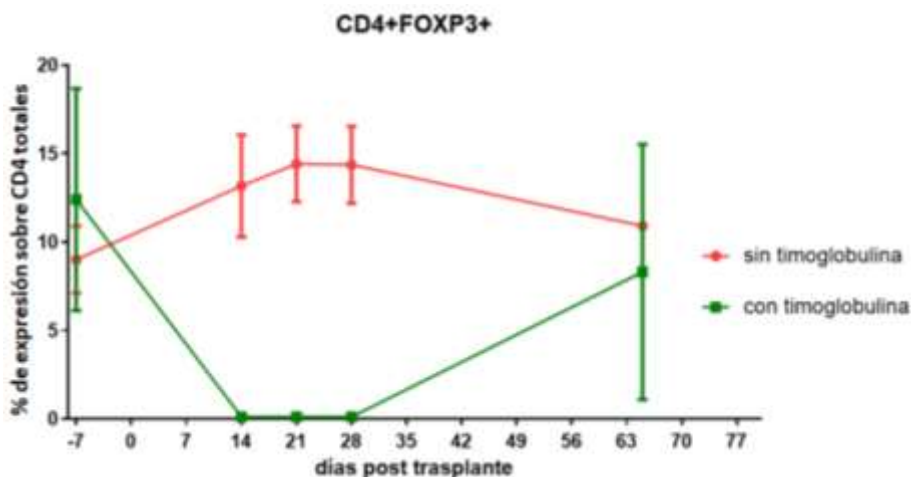


Figura 42. Porcentaje de expresión de FOXP3 en los CD4 totales en diferentes puntos de corte temporales del período post-trasplante; se observan las curvas de los pacientes que recibieron globulina anti linfocitaria (verde) y los que no la recibieron (rojo).

Excluidas las muestras de los pacientes que recibieron globulina anti linfocitaria, se encontró un incremento de los Tregs (definidas como CD4+/FOXP3+) durante los días +14 a +21 del período peri-*engraftment* (figura 43 y 44).

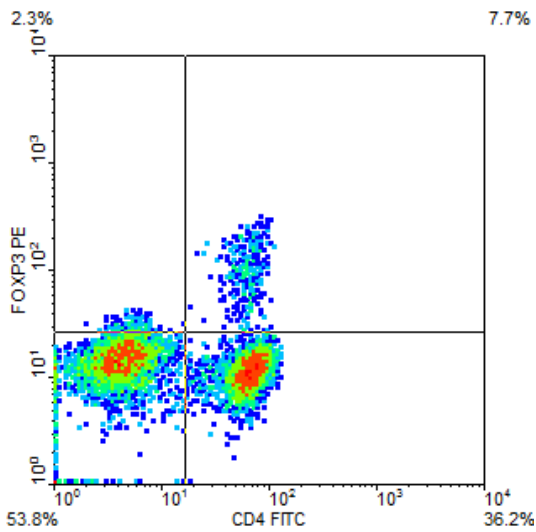


Figura 43. Presencia de linfocitos T reguladores en un paciente post trasplante autólogo por Mieloma Múltiple

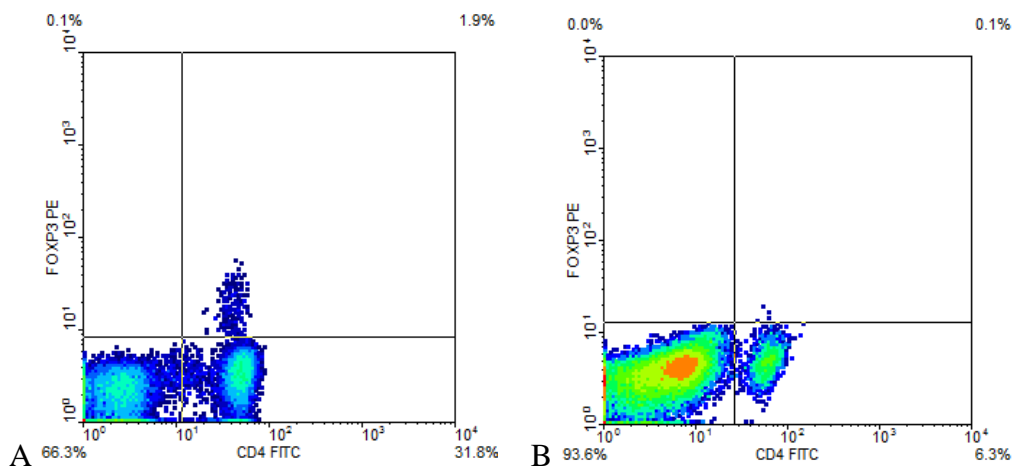


Figura 44. Presencia de células T-Reguladoras en un paciente post trasplante alogénico relacionado por Leucemia Linfoblástica Aguda. Se observa el pico de expresión de doble positivas CD4/FOXP3 en el día +14 (A) que luego disminuye considerablemente una semana después (B).

El pico de expresión de los Tregs fue diferente según el tipo de trasplante. Los pacientes que recibieron un trasplante autólogo tuvieron un pico de expresión al día +14 (16,8%) descendiendo en los sucesivos controles a valores cercanos al 5%. En el caso de los trasplantes alogénicos, se observó un pico de 11,8% más tardío (día +21), manteniéndose en niveles similares hasta el día +28 y descendiendo en el control más alejado (2-3 meses) (figura 45).

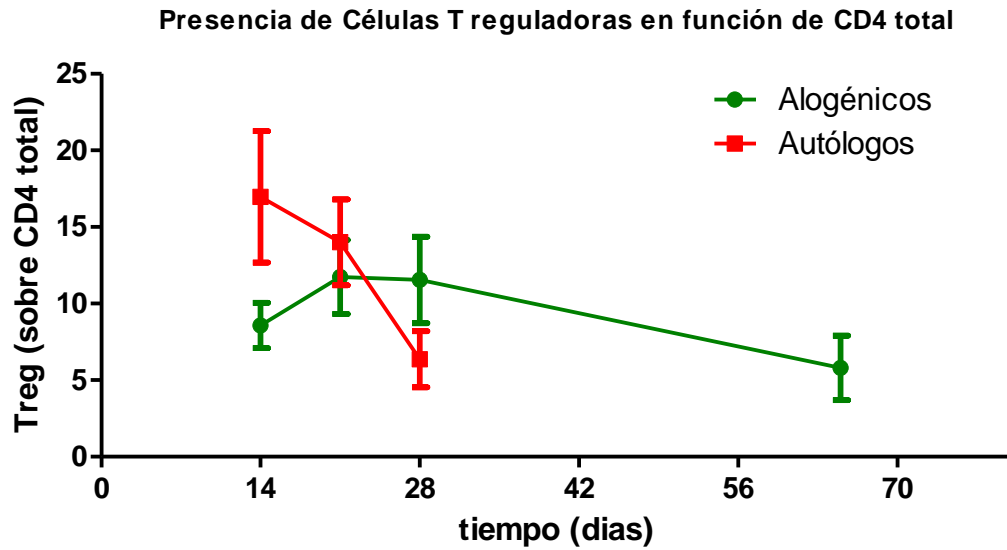


Figura 45. Cinética del porcentaje de los Tregs sobre las CD4 totales en el período post trasplante. En rojo se observan los pacientes que recibieron un trasplante autólogo y en verde alogénico.

Con respecto a la expresión de TGF- $\beta$ 1, en un total de 18 pacientes evaluados, la expresión de este marcador fue menor al 1% para las células FOXP3 positivas y entre 1-2% para las CD4+ totales (figura 46). El pico de expresión en la ventana de los linfocitos del 4,2% fue en el día +14 (figura 47).

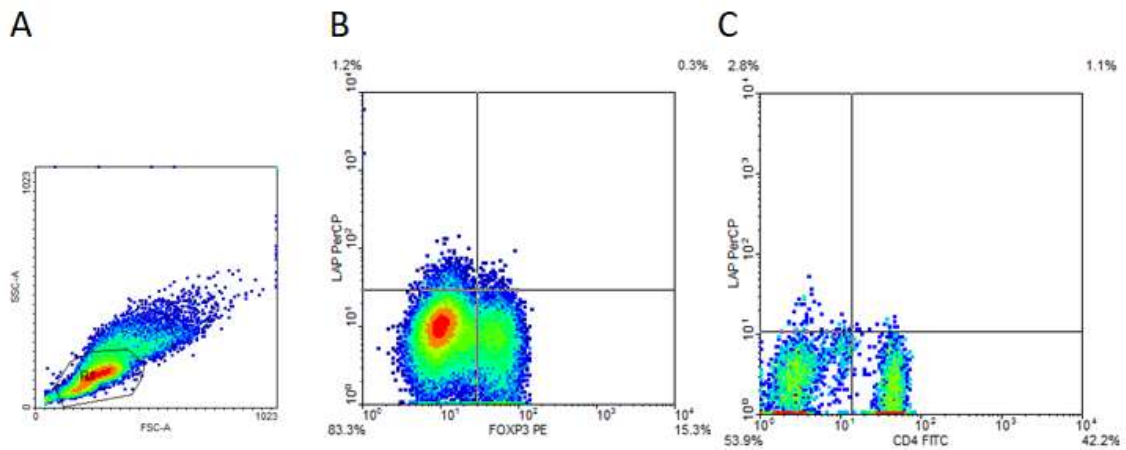


Figura 46. Análisis de expresión de TGF- $\beta$ 1 en un paciente que recibió un trasplante autólogo por Mieloma Múltiple. A: ventana de selección de linfocitos. B: expresión de LAP/FOXP3 doble positivos. C: expresión de LAP/CD4 doble positivos

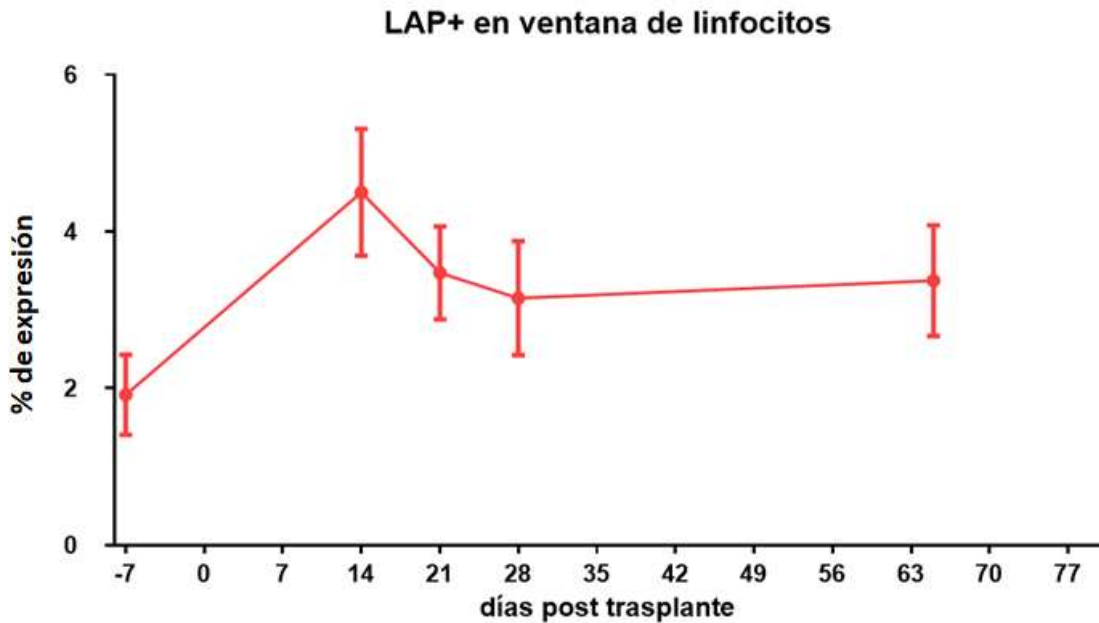


Figura 47. Cinética del porcentaje de la expresión de TGF- $\beta$ 1 en los linfocitos totales en el período post trasplante. El pico de expresión es en el día 14, para luego descender y sostenerse en los siguientes 2-3 meses en valores ligeramente por encima del basal. LAP, proteína asociada de latencia.

### 3.1.3. Análisis de la sobrevida en función de los niveles plasmáticos de TGF- $\beta$ 1

A partir de muestras tomadas pre-trasplante y congeladas se realizó el dosaje de TGF- $\beta$ 1, mediante la técnica de luminex (métodos capítulo 2, 2.7), en 434 pacientes, 546 donantes, con un total de 385 pares pertenecientes a la cohorte de trasplantes NR del Anthony Nolan. La media de secreción para los pacientes fue de 767 pg/mL y para los donantes fue de 870 pg/mL.

No se evidenciaron diferencias en la sobrevida según los niveles plasmáticos de los pacientes. Los pacientes con niveles plasmáticos menores a la media, presentaron una SG a 5 años de 43% vs 47% ( $p=0,175$ , prueba de log-rank), una SLE a 5 años de 32% vs. 31% ( $p=0,751$ , prueba de log-rank), una MLE de 29% vs. 22% ( $p=0,145$ , prueba de Gray) y una recaída de 37% vs. 45% ( $p=0,225$ , prueba de Gray). Similar a lo observado en los pacientes, los niveles plasmáticos en los donantes tampoco mostraron diferencias significativas. Los receptores de donantes con niveles plasmáticos menores a la media presentaron una SG a 5 años de 44% vs. 40% ( $p=0,551$ , prueba de log-rank), una SLE de 28% vs. 30% ( $p=0,525$ , prueba de log-rank), una MLE de 29% vs. 27% ( $p=0,513$ , prueba de Gray) y una recaída de 42% vs. 42% ( $p=0,866$ , prueba de Gray).

## 3.2. Impacto de los polimorfismos del gen de *TGFBI* sobre la funcionalidad de la citoquina

### 3.2.1. Patrón de supresión de los Tregs

Para evaluar la capacidad auto supresora de los Tregs sobre CD4 efectoras, se siguieron los métodos descritos en la correspondiente sección (métodos capítulo 2.2,2 y 2,7), con dos sujetos por genotipo y, a su vez, cada sujeto por triplicado. Se comparó células CD4 efectoras sin estimulación, con estimulación (antiCD3 y antiCD28, más IL2) y con estimulación más Tregs autólogos.

Se observó que los Tregs de los sujetos +29 CC tuvieron una capacidad de suprimir significativamente mayor que las provenientes de individuos TC o TT. En la figura 48 se observa la supresión de la proliferación celular (método de Timidina) de las CD4 efectoras por parte de los Tregs autólogos en función del genotipo +29. En la figura 49 se presenta la supresión en valores relativos (porcentual obtenido de la reducción de la media de cpm con Tregs autólogos en relación la media de cpm sin Tregs) comparando los tres genotipos (CC 92% vs. TC 80% vs. TT 70%,  $p=0,013$ , prueba de Mann-Whitney).

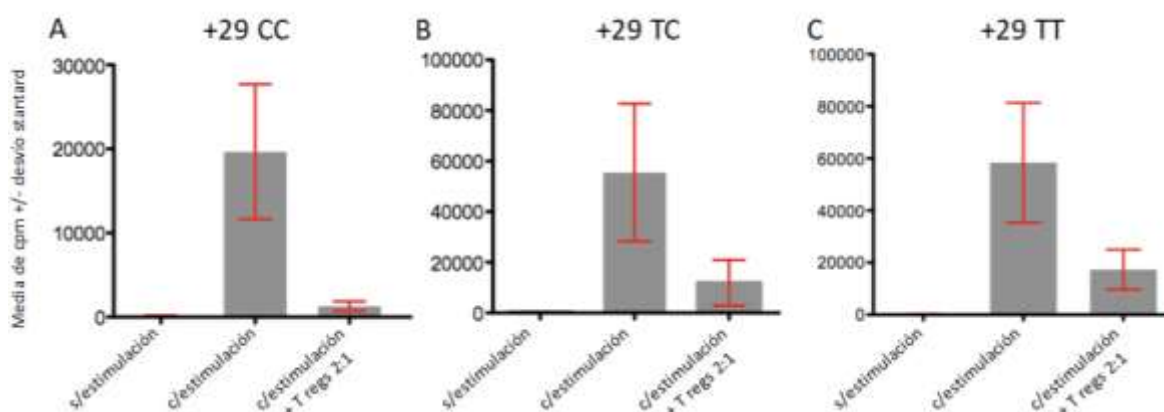


Figura 48. Análisis de supresión de la proliferación celular (método de Timidina) de CD4 efectoras por parte de los linfocitos T reguladores autólogos en función del SNP +29. En cada gráfico se observa la media de cpm sin estimulación, con estimulación y con estimulación + Tregs autólogos. A: sujetos +29 CC. B: sujetos +29 TC. C: sujetos +29 TT.



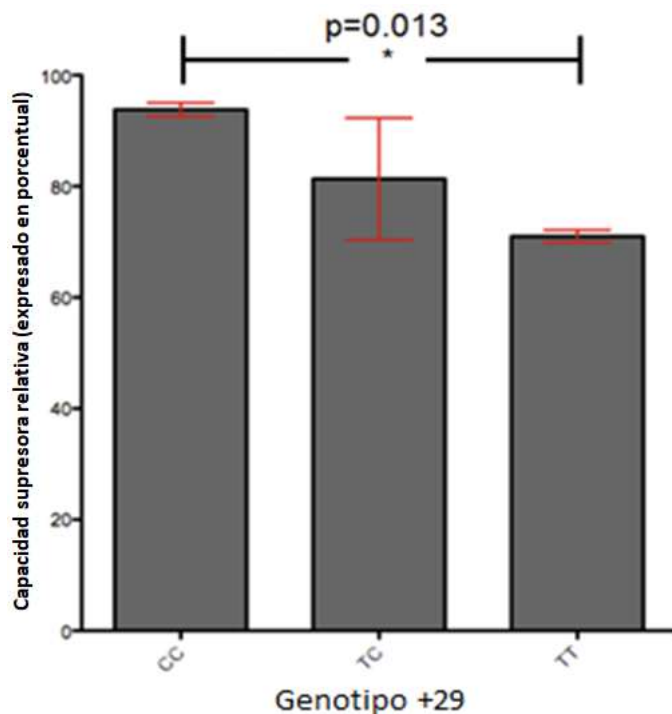


Figura 49. Análisis de supresión de la proliferación celular de CD4 efectoras por parte de los linfocitos T reguladores autólogos en función del SNP +29 (expresado en porcentual). Prueba de Mann-Whitney

### 3.2.2. Niveles plasmáticos de TGF-β1 en función de los SNP +29 y +74

#### *Análisis de la secreción según SNP +29*

El genotipo de mayor nivel de secreción fue el TC (mediana y rangos intercuartilo) (CC 497 pg/mL [251-1035] vs. TC 675 pg/mL [365-1077] vs. TT 515 pg/mL [208-1009]). En el análisis por pares se observó una diferencia significativa entre TC y TT ( $p=0,045$ ), mientras que no fue significativa al comparar los restantes genotipos (TC vs. CC,  $p=0,165$ , y CC vs TT,  $p=0,635$ , figura 50 A).

En el caso de los donantes, no se encontraron diferencias significativas (CC 751 pg/mL [372-1094] vs. TC 722 pg/mL [409-1191] vs. TT 773 pg/mL [420-1108], prueba de Kruskal Wallis,  $p=0,835$ ) (figura 50 B).

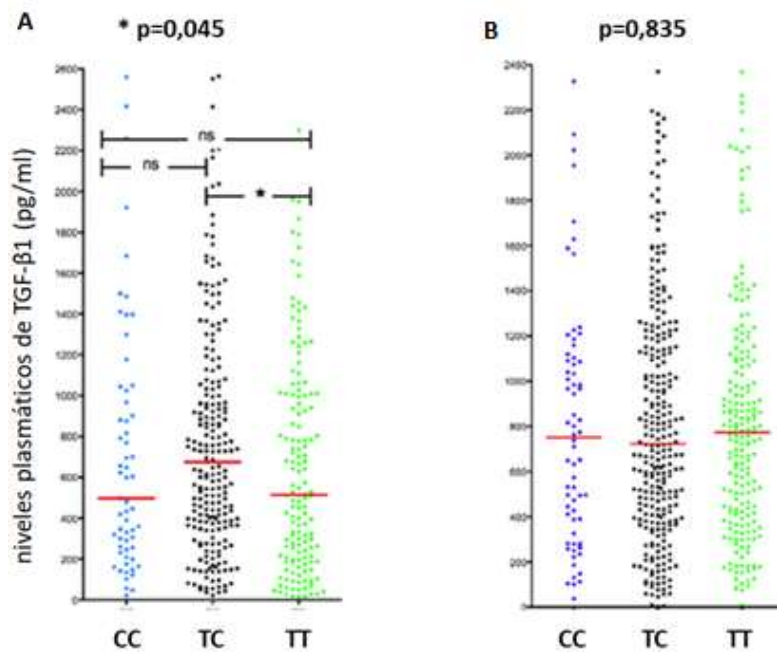


Figura 50. Niveles plasmáticos de TGF-β1 según genotipo +29. A: gráfico comparativo de pacientes según los tres genotipos +29, los paciente TC mostraron mayores niveles que los TT. B: gráfico comparativo de los donantes según el genotipo +29, sin diferencias significativas.

#### *Análisis de la secreción según SNP +74*

Para el análisis según el SNP +74, por bajo número de pacientes y donantes CC, se compararon los pacientes GG vs. GC/CC. La mediana de secreción de los pacientes GG fue de 592 pg/mL (275-1036), comparada con la de los pacientes GC/CC que fue de 711 pg/mL (305-1086) (p=0,550, prueba de Mann-Whitney) (figura 51 A). Se evidenció una tendencia a que los donantes GG presenten menores niveles de secreción (GG 733.1 pg/mL (399-733) vs. GC/CC 801 pg/mL (442-1266]) (p=0,090, prueba de Mann-Whitney) (figura 51 B).

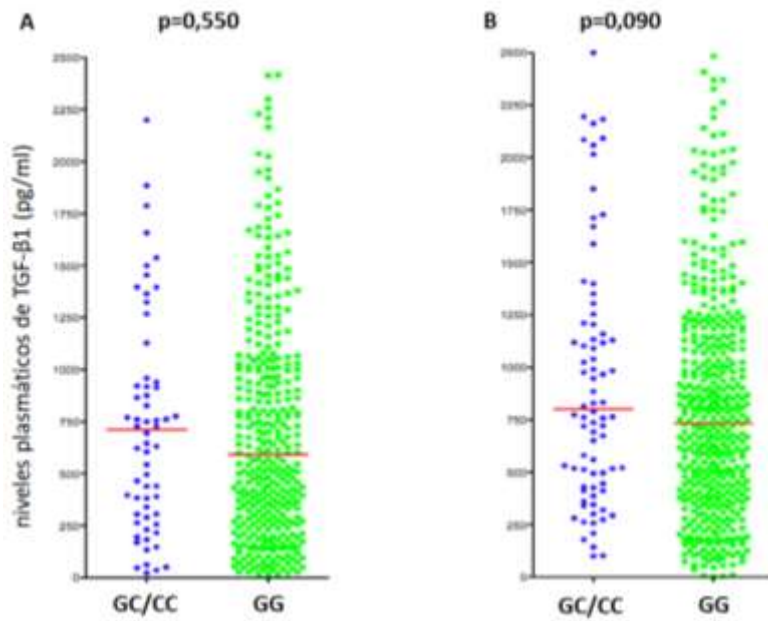


Figura 51. Niveles plasmáticos de TGF-β1 según genotipo +74. A: gráfico comparativo de pacientes según genotipo +74, no se evidenciaron diferencias significativas. B: gráfico comparativo de donantes según genotipo +74, la presencia del alelo C se asoció a una tendencia a mayores niveles.

# DISCUSIÓN

*El papel de las distintas citoquinas asociadas a eventos de morbimortalidad en el trasplante alogénico ha cobrado especial interés en los últimos años. Como parte de esta línea de trabajo, la presente experiencia se focalizó en  $TGF\beta 1$ . El SNP +29 C>T del gen *TGFBI* se asocia con una mayor susceptibilidad a desarrollar ciertas complicaciones relacionadas al trasplante de CPH alogénico relacionado y no relacionado. Estos hallazgos cobran mayor valor en el sub-análisis de los pacientes que recibieron acondicionamientos mieloablativos, con un incremento significativo de la MLE para los receptores homocigotas del alelo +29 C, mostrando un valor pronóstico independiente de variables clínicas analizadas en el capítulo previo.*

El posible rol de TGF- $\beta$ 1 en el contexto del trasplante alogénico comprende diferentes aspectos incluyendo las células que lo secretan, la modulación de la secreción/expresión por modalidades propias del procedimiento (régimenes de acondicionamiento y terapias inmunosupresoras) y la variabilidad de su perfil pleiotrópico, además, la presencia de variantes asociadas a su expresión diferencial y su influencia en el contexto de este escenario.

Los linfocitos T, fundamentalmente Tregs, seguido de monocitos, plaquetas, células endoteliales y fibroblastos son la fuente principal de TGF- $\beta$ 1 (Blobe, N Eng J Med 2000). En las etapas muy tempranas, luego del daño sobre el sistema hematopoyético/inmunológico ocasionado por el régimen de acondicionamiento, en particular por los mieloablativos, TGF- $\beta$ 1 sería principalmente secretada por las células endoteliales del receptor. A partir del *engraftment*, los linfocitos T del donante, mayoritariamente Tregs, serían su fuente principal; mientras que, en etapas más tardías este efecto sería mediado por los monocitos (Banovic, Blood 2005). Las terapias inmunosupresoras con capacidad de linfodepleción (globulina antilinfocitaria y alentuzumab, entre otras) anularían la secreción por parte de los linfocitos del donante durante las etapas descriptas.

Entre los efectos de TGF- $\beta$ 1 en este escenario, posiblemente el más relevante sea su capacidad inmunosupresora seguido de la pro-fibrótica. Diferentes autores han descrito una cinética dual post trasplante (Banovic, Blood 2005; Arrieta Bolaños, In J Immun genetics 2012; Carli, Biol Blood Marrow Transplant 2012; MacDonald, Biol Blood Marrow Transplant 2018). Inicialmente altos niveles plasmáticos generarían un estado de mayor inmunosupresión y, por ende, menor incidencia de EICH aguda y menor capacidad de vigilancia inmunológica contra patógenos (mayor riesgo infeccioso). En etapas más alejadas los niveles elevados se asociarían a su acción profibrótica y, por ende, a mayor riesgo de EICH crónica.

Por último, los polimorfismos que afectan el proceso de secreción alterarían los niveles plasmáticos o la expresión en membrana de TGF- $\beta$ 1 influyendo en el contexto mencionado. El alelo ancestral C del SNP +29 estaría asociado a mayores niveles plasmáticos (Yamada, J Bone Miner Res 1998; Awad, Transplantation 1998; Yokota, Circulation 2000; Ziv, JAMA 2001; Gewaltig, Clin Chim Acta 2002; Dunning, Cancer Res 2003; Mak, Cytokine 2007) y, por lo tanto, su presencia disminuiría el riesgo de desarrollar EICH aguda, incrementaría el riesgo de eventos infecciosos graves y, en etapas alejadas, se relacionaría con una mayor susceptibilidad a desarrollar EICH

crónica. Estas complicaciones están directamente relacionadas con la morbimortalidad asociada al procedimiento, pudiendo influir en los eventos de sobrevida, en particular en la MLE.

### **1. Polimorfismos de *TGFBI* y trasplante alogénico relacionado**

La población analizada, incluyendo la cohorte de trasplante alogénico del Hospital Austral, es comparable a las descritas en trabajos retrospectivos en cuanto a características demográficas, patología y *status* de enfermedad, al igual que la incidencia general de los eventos ocurridos (Sorrer, Blood 2005; Raiola, Biol Blood Marrow Transplant 2014). En el presente análisis se evaluó la posible asociación de los SNP +29 y +74 del gen *TGFBI* con los resultados del trasplante alogénico relacionado, estudiándose el impacto de ambos por separado, sin análisis de haplotipos. Los resultados más relevantes han sido predominantemente para el SNP +29.

Las frecuencias alélicas pueden variar según los grupos étnicos. En la población analizada de origen argentino, la frecuencia del alelo C en el SNP +29 en receptores fue del 50% (23% homocigota) y en donantes 48%, mientras que el alelo G en el SNP +74 fue del 95% y 96% respectivamente. Para evaluar la variabilidad de los alelos, se realizaron búsquedas en Ensembl ([https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation)) y SNPs 1000 genomas del Instituto Estadounidense de Biotecnología (NCBI por sus siglas en inglés *National Centre for Biothechnology Information*) ([http://phase1browser.1000genomes.org/Homo\\_sapiens/Variation](http://phase1browser.1000genomes.org/Homo_sapiens/Variation)) (ambas búsquedas al 01/09/2018). Los polimorfismos del gen *TGFBI* presentan un grado de variación en sus frecuencias alélicas de acuerdo a las poblaciones analizadas. Para el SNP +29, la frecuencia del alelo C varía entre 27-32% (Finlandia) a 61-63% (ciertas poblaciones chinas), siendo la frecuencia promedio del 44-45%. Los porcentajes observados en la presente serie son acordes a los observados en otras poblaciones americanas que en su conjunto rondan el 46-50%, al igual que la frecuencia del genotipo +29 CC (24% de los receptores). En el caso del SNP +74, la frecuencia del alelo ancestral G varía entre 90% (ciertas poblaciones africanas como de Sierra Leona) al 100% (ciertas poblaciones chinas y en Tokio, Japón), siendo en promedio del 95%. Este porcentaje es similar al descrito en nuestra población y consistente con el promedio observado en población americana proveniente de México, Puerto Rico y Colombia.

Existen pocos estudios publicados en trasplante alogénico relacionado que hayan evaluado la asociación entre los SNP del gen *TGFBI* y la EICH aguda. Algunos han

analizado según el genotipo por separado y otros según el haplotipo. Leffel y col., de la universidad Johns Hopkins, describen en 50 pacientes con trasplante alogénico en su mayoría relacionado, una mayor incidencia de EICH aguda severo en los pacientes con el genotipo +74 GG, sin mención del SNP +29 (Leffel, Transplant Proc 2001). Un grupo japonés analizó esta asociación en una cohorte pequeña de pacientes pediátricos que recibieron un trasplante alogénico relacionado. Encontraron que quienes recibían injertos provenientes de donantes con genotipo +29 TT presentaban una disminución de la incidencia de EICH aguda. De la misma manera, polimorfismos del gen del receptor de TGF- $\beta$ 1 II, tanto en pacientes como donantes, presentaban una asociación con EICH (Hattori, Bone Marrow Transplant 2002).

En una serie reducida de origen iraní, al igual que el estudio de casos-control de origen japonés, se halló una asociación entre el incremento de la incidencia de EICH aguda y la presencia del alelo +29 C luego del trasplante alogénico relacionado. Sin embargo, el grupo iraní observó el impacto con respecto al genotipo de los donantes, mientras que, el grupo japonés al de los pacientes (Noori-Daloi, Ann Transplant 2007). La frecuencia del alelo C en la población iraní presenta una peculiaridad en cuanto al genotipo de *TGFBI* (cerca del 40% de la población es homocigota para este alelo) siendo considerablemente mayor al de las poblaciones europeas y japonesas (20% aproximadamente) (Amani, Int J Immunog 2008).

Laguila Visenteiner y col. describieron una población de 119 trasplantes histoidénticos relacionado y no encontraron diferencias significativas en un análisis de haplotipo en el que combinaron los SNP +29 y el +74 (Laguila Visenteiner, Cytokine 2005), al igual que una publicación del grupo de origen egipcio (Kamel, Cytokine 2018). Con resultados similares, Xiao y col. no hallaron diferencias en la incidencia de EICH aguda en 102 pacientes según el SNP +29 luego de trasplante alogénico relacionado (Xiao, Biol Blood Marrow Transplant 2011). El único estudio con un número similar de trasplantes que encontró una asociación entre el SNP +29 y EICH fue el grupo polaco de la universidad de Gdansk. Los receptores TT presentaron un incremento del riesgo de desarrollar tanto EICHa severo como crónica; mientras que, los de donantes CC presentaron un incremento significativo de las tasas de EICH crónica (Dukat-Mazurek, Hum Immunol 2017). Ninguno de estos estudios evaluó en particular la población de trasplantes con acondicionamientos mieloablativos.

En el presente estudio, los SNP +29 y +74 no fueron relevantes en la cohorte global. Sin embargo, el SNP +29 se relacionó con la morbimortalidad asociada al

procedimiento en el sub-análisis de los trasplantes con acondicionamiento mieloablativo. En primer lugar, los pacientes +29 TT presentaron un incremento significativo de las tasas de EICH aguda y de las formas clínicamente significativas de más de 5 veces independiente de otros parámetros. En el caso de los donantes, aquellos pacientes que recibieron un trasplante con donantes +29 TT tendieron a una mayor incidencia de EICH aguda y las formas clínicamente significativas.

Clásicamente se ha asociado la EICH, sobre todo las formas crónicas, con el desarrollo del fenómeno injerto contra enfermedad (Deeg, Blood 2010; Gyurkocza, Blood 2014; Baron, Haematologica 2017). Se ha demostrado que linfocitos T del injerto serían los responsables del desarrollo de ambos fenómenos. Tanto las estrategias de depleción linfocitaria como el uso de donantes singénicos disminuyen considerablemente ambas reacciones; mientras que, la infusión de linfocitos del donante puede exacerbarlas (Baron, J Clin Oncol 2005).

Los donantes +29 TT presentaron un incremento significativo de la tasa de recaída sugiriendo, además, un efecto de dosis entre TT, TC y CC. Opuesto a lo esperado en relación con la asociación entre EICH y recaída, e insinuando que el genotipo +29 TT de los donantes se asociaría a un menor efecto de injerto contra enfermedad. Este incremento mayor a dos veces en comparación con los otros genotipos fue independiente a otras variables como el *status* de la enfermedad pre-trasplante, la patología de base o el acondicionamiento. Esta observación se vincula con el incremento significativo de las tasas de EICH crónica severo para los receptores de donantes +29 CC, similar a lo descrito por el grupo polaco (Dukat-Mazurek, Hum Immunol 2017). Resultado que obliga a disecar cual puede ser el rol de TGF- $\beta$ 1 en la enfermedad injerto contra huésped, ya que los portadores del genotipo TT (bajo productor) serían más susceptibles a desarrollar más EICH aguda pero también mayor tasa de recaída, y los homocigotas CC (alto productor) más EICH crónica extenso.

Como ya fuera introducido previamente, Banovic y col. de la universidad de Brisbane, describieron un comportamiento “dual” de TGF- $\beta$ 1 en un modelo murino de trasplante alogénico (Banovic, Blood 2005). Los autores observaron que luego de acondicionamientos mieloablativos, en las etapas tempranas el TGF- $\beta$ 1 era secretado por los linfocitos del donante y el bloqueo de su producción se asociaba a un incremento de la incidencia de EICH aguda pero también a mayor tasa de recaída. Por el contrario, en las etapas tardías era secretado por los monocitos del donante y el bloqueo de su producción se asociaba a menor tasa de EICH crónica. Giroux y col. confirmaron la



importancia de las vías de señalización de TGF- $\beta$ 1 en el desarrollo de la EICH aguda en un modelo murino: los receptores de donantes con abolición de SMAD3 desarrollaron EICH aguda letal intestinal causada por la infiltración de linfocitos Th1 (Giroux, Blood 2011).

Numerosos estudios *in vivo* de pacientes trasplantados arrojan resultados similares. En etapas tempranas, niveles altos de TGF- $\beta$ 1 fueron asociados a una reducción de las tasas de EICH aguda, posiblemente relacionado a la función inmunosupresora de las Tregs (Laguila-Visenteiner, Exp Hematol 2003; Li, Leuk Res 2010; Niu, Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2010). En etapas tardías, por el contrario, niveles elevados de la citoquina se asociaron con un incremento del EICH crónica, posiblemente relacionado a su función pro-fibrótica (Liem, Transplantation 1999; Kyrz-Krzemien, Med Sci Monit 2011; Ellison, Scan J immunol 2012, MacDonald, Biol Blood Marrow Transplant 2018).

Tanto Arrieta Bolaños y col. como Carli y col. apoyan el efecto dual de TGF- $\beta$ 1 en el contexto del trasplante hematopoyético (Arrieta Bolaños, In J Immun genetics 2012; Carli, Biol Blood Marrow Transplant 2012). El grupo canadiense agrega enfoques sobre el rol anti tumorigénico y protector de las vías de señalización de TGF- $\beta$ 1. Para el posible efecto antitumoral describen mecanismos directos, sobre la regulación de genes promotores del crecimiento como el *MYC* y la estimulación de genes inhibidores del ciclo celular como *CDKN1A* (comúnmente conocido como p21), y mecanismos indirectos, a través de cambios en el microambiente tumoral. Por otro lado, destacan la importancia en la protección de la EICH aguda intestinal de la molécula SMAD3 en la cascada intracelular gatillada por TGF- $\beta$ 1 (Carli, Biol Blood Marrow Transplant 2012). En este último contexto, recientemente se ha detallado la importancia del balance TGF- $\beta$ 1/SMAD2/SMAD3 y SMAD7 en la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal. Modelos murinos en los que se suprime la acción de SMAD7, al restaurar la fosforilación de SMAD2/3, se reestablece la vía inhibitoria de TGF- $\beta$ 1 y se reduce la inflamación en estos tejidos (Troncone, Front Immunol 2018).

El grupo australiano de MacDonald y col. de la universidad de Brisbane, describe el rol clave de TGF- $\beta$ 1 en los mecanismos pro-fibróticos de la EICHc. TGF- $\beta$ 1 estimularía la activación y proliferación de monocitos mediante el factor estimulantes de colonias-1. A su vez, en biopsias de lesiones secundarias a EICHc se encontraron abundantes macrófagos en íntimo contacto con miofibroblastos promoviendo la producción de colágeno a través de diferentes mediadores entre los que se destaca TGF-

$\beta 1$  (MacDonald, Biol Blood Marrow Transplant 2018). Estos hallazgos han motivado estudios de inhibidores farmacológicos de vías del TGF- $\beta 1$  en este escenario. En la actualidad se están llevando adelante estudios prospectivos con pirfenidona, una molécula anti-fibrótica, cuyo efecto se debe a una reducción en la producción de TGF- $\beta 1$  por parte de los macrófagos. Este fármaco demostró, *in vivo*, tener un efecto beneficioso sobre la EICH crónica, fundamentalmente, pulmonar (Du, Blood 2017).

En relación con los análisis de sobrevida, y siguiendo con el especial enfoque sobre la mortalidad post trasplante, cobra relevancia la asociación del SNP +29 con la MLE. Los pacientes +29 CC (alto productor) tuvieron un incremento significativo de la MLE post trasplante alogénico luego de acondicionamientos mieloablativos, tanto en su evaluación temprana (al día 100) como en la evaluación a largo plazo, cuando se comparó con los pacientes CT/TT. El efecto deletéreo fue independiente de las variables clínicas descriptas en el capítulo previo como la edad y el sexo del paciente e incluso de las comorbilidades. Únicamente Xiao y col. evaluaron la asociación del SNP +29 y los eventos de sobrevida luego del trasplante alogénico relacionado sin hallazgos relevantes. Los autores no describieron los factores de riesgo para la MLE ni realizaron un sub-análisis del grupo de trasplantes que recibieron acondicionamientos mieloablativos (Xiao, Biol Blood Marrow Transplant 2011).

Resulta de interés que los pacientes +29 CC tuvieran un incremento en el riesgo de mortalidad por síndrome de oclusión sinusoidal apoyando la asociación entre TGF- $\beta 1$  y este síndrome (Ho, Bone Marrow Transplant 2008). Se postula que niveles plasmáticos elevados de TGF- $\beta 1$  pre-trasplante aumentarían el riesgo de esta complicación (Anscher, NEJM 1993). Posteriormente, Pihusch y col. demostraron que la secreción del inhibidor del activador de plasminógeno por parte de células endoteliales hepáticas era estimulada por las plaquetas a través de TGF- $\beta 1$  (Pihusch, Thromb Res 2005). Robinson y col. profundizaron este concepto en un modelo murino de síndrome de oclusión sinusoidal asociado a la combinación de los agentes quimioterapéuticos capecitabina-oxaliplatino para cáncer de colon metastásico. Aquellos animales que desarrollaron la complicación presentaban un incremento significativo de las células estrelladas hepáticas y sobre-expresión del inhibidor de las metaloproteinasas asociado a un incremento significativo de TGF- $\beta 1$  (Robinson, Br J Cancer 2013).

Como se mencionó previamente, los acondicionamientos mieloablativos generan la llamada “tormenta de citoquinas” (Melenhorst, Haematologica 2012; Chang, Biol

Blood Marrow Transplant 2014), escenario en el cual el SNP +29 fue más relevante. Posiblemente, la cascada de citoquinas desarrollada a partir del régimen de acondicionamiento mieloablatoivo combinado con mayores niveles de TGF- $\beta$ 1 en el medio y, por consiguiente, mayor generación de Tregs inducidos con capacidad inmunosupresora se vinculen con los resultados obtenidos (Nakamura, J Exp Med 2001; Zheng, J Immunol 2002; Letterio, Oncogene 2005; Li, Cell 2008). Por otro lado, el grupo australiano de la universidad de Brisbane ha descrito el potencial rol protector de linfocitos T reguladores CD8+ (CD8+/FoxP3+) en la EICH aguda y la importancia de TGF- $\beta$ 1 en su diferenciación. En un modelo murino de trasplante alogénico, células dendríticas del receptor, a través de un mecanismo dependiente de TGF- $\beta$ 1, estimularían la conversión de CD8+ en Tregs (CD8+FoxP3+) (Robb, Blood 2012).

El genotipo +29 CC de *TGFBI* en los pacientes se relacionaría independientemente con la MLE luego del trasplante con donante emparentado. En la cohorte analizada, el SNP +29 fue el factor de riesgo más relevante con un incremento de 4 veces de la mortalidad relacionada al procedimiento. El modelo del análisis multivariado para MLE sopesó factores mencionados en capítulos previos como la edad, el sexo del paciente e, incluso, el *score* de HCT-CI, aunque este último parámetro pudo ser evaluado en la mitad de los pacientes. En relación al genotipo del donante, el SNP +29 se destacó como un factor de riesgo para predecir la recaída, independiente de otras variables como el *status* de la enfermedad. Los donantes +29 TT duplicaron su riesgo de recaída con un impacto en el límite de la significancia estadística para la SLE y la SG.

## **2. Polimorfismos de *TGFBI* y trasplante alogénico con donante no relacionado**

La población británica analizada reúne características demográficas y de incidencia de eventos post-trasplante similares a los descritos en series retrospectivas en las cuales se emplean donantes NR, con la excepción del uso casi universal de depleción linfocitaria (Pidala, Blood 2014). Al igual que para la cohorte de donantes emparentados, en el presente análisis se evaluaron los SNP +29 y +74 del gen *TGFBI* por separado, sin estudio de haplotipos. Nuevamente, los resultados relevantes han sido predominantemente para el SNP +29.

Las frecuencias del alelo +29 C en receptores y donantes fue del 40%, superiores a las observadas en la población argentina, y la del alelo +74 G del 90%. Según los informes publicados por Ensembl ([https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation)) y 1000 genomas ([http://phase1browser.1000genomes.org/Homo\\_sapiens/Variation](http://phase1browser.1000genomes.org/Homo_sapiens/Variation))

(ambas búsquedas al 01/09/2018), estos porcentajes son similares a los observados en población europea del 38-40% para el alelo +29 C (10-15% de homocigotas para el alelo C) y del 90-92% del alelo +74 G.

En la serie de trasplantes con donante NR, los receptores +29 CC presentaron una menor incidencia de la EICH aguda, sobre todo de sus formas clínicamente significativas. Esta menor susceptibilidad se mantuvo en los trasplantes histoidénticos, al excluir aquellos que presentaban algún tipo de incompatibilidad HLA. Similar a lo observado en la cohorte de trasplantes relacionados que recibieron acondicionamientos mieloablativos, los genotipos de mayor secreción de TGF- $\beta$ 1 (alelo C) presentaron menor incidencia de EICH aguda. Siguiendo con lo expuesto previamente, la mayor secreción de TGF- $\beta$ 1 generaría un incremento de los Tregs inducidas tanto CD4+ como CD8+ y, por ende, menor desarrollo de EICH aguda (Laguila-Visenteiner, Exp Hematol 2003; Li, Leuk Res 2010; Niu, Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2010; Robb, Blood 2012).

En cuanto al genotipo de los donantes, se observó una tendencia a reducir la EICH aguda clínicamente significativas (GII-IV) sin asociación con otro evento clínico estudiado. El hallazgo de que en este escenario de trasplante con donante NR el genotipo del donante no haya tenido la misma influencia que en el trasplante relacionado puede deberse a que casi la totalidad de los trasplantes fueron realizados con depleción *in vivo* de células T con Alemtuzumab para prevenir la EICH. El Alemtuzumab se une al CD52 presente en grandes cantidades en los linfocitos T y B y, en menores cantidades, en los *natural killer*, monocitos y macrófagos. Actúa a través de la citólisis celular dependiente de anticuerpos y la lisis mediada por el complemento y su efecto puede persistir entre 1 y 2 meses desde la administración (Kanda, Int J Hematol 2011). Por esta razón, esta terapia modularía los efectos asociados a la variante genotípica en los linfocitos del donante.

El mismo grupo de la universidad de Zhejiang analizó la asociación del SNP +29 y el desarrollo de EICH en 130 trasplantes alogénicos NR, sin encontrar resultados estadísticamente significativos (Xiao, Biol Blood Marrow Transplant 2011). El grupo del Anthony Nolan Trust tampoco encontró asociación entre el SNP +29 y la EICH aguda en 539 trasplantes alogénicos NR con acondicionamiento mieloablativos (Arrieta-Bolaños, Haematologica 2016). Debido a las discrepancias entre los escasos análisis publicados, en el año 2015 se realizó un metanálisis. Dadas las limitaciones del estudio, incluyendo sólo cuatro series para el análisis del genotipo del receptor, tres para

el de los donantes con poca representatividad de población caucásica, no habría suficiente evidencia para afirmar una asociación entre el SNP +29 y la EICH aguda (Zhang, Oncotarget 2016).

El principal hallazgo de esta cohorte con donante no emparentado es la confirmación del mayor riesgo de MLE para los pacientes +29 CC que recibieron un acondicionamiento mieloablativo. Además, cerca de la mitad de los pacientes +29 CC fallecieron dentro de los 3 años del trasplante por un evento asociado al mismo, comparado con un tercio de los receptores TC y un cuarto de los TT, sugiriendo un efecto de dosis. Las principales causas de muerte fueron las infecciosas. El estado de inmunosupresión severa luego de acondicionamientos mieloablativos sumado a los tratamientos farmacológicos para prevenir la EICH genera un riesgo elevado de complicaciones infecciosas. El hallazgo coincidente del impacto del SNP +29 sobre la MLE luego de acondicionamientos mieloablativos, al igual que en los trasplantes relacionados, hace reflexionar sobre el potencial rol de TGF- $\beta$ 1 en este escenario. Más allá de la modificación del estado inflamatorio en relación a los niveles de TGF- $\beta$ 1 y la tormenta de citoquinas ya mencionada previamente, la relación intrínseca de TGF- $\beta$ 1 con la microbiota podría explicar en parte los hallazgos descritos (Troncone, Front Immunol 2018; Bouche, Clin Transl Immunology 2017). Esquemas mieloablativos generan mucositis severa y, por ende, cambios marcados en la microbiota. Como se describiera previamente, ciertos patógenos como el *Bacterioides fragilis* y algunos subtipos de *Clostridium* inducirían la diferenciación y proliferación de Tregs a través de TGF- $\beta$ 1, a la vez que induciría células linfoides innatas tipo 1 y 3 reduciendo la activación de Th1 y Th2, modificándose la vigilancia inmunológica.

El grupo de la Universidad de Michigan describió la importancia de TGF- $\beta$ 1 sobre la reconstitución inmune post trasplante en un modelo murino de trasplante mieloablativo. La sobre-expresión de TGF- $\beta$ 1 y el consecuente corrimiento de los fenotipos CD4 de Th1 a Th17, generaron eventos infecciosos virales pulmonares severos independientemente de la presencia de Tregs. Esta complicación inmunológica se vio corregida en ratones con el receptor de TGF- $\beta$ 1 deletado (Coomes, J Immunol 2010).

En este contexto, la presencia de variantes polimórficas que favorecerían una expresión diferencial podría influir en los efectos pleiotrópicos de TGF- $\beta$ 1 entendiendo que los niveles secretados modifican el estado inmunológico del paciente (Johnston, Cell Immunol 2016; Bouche, Clin Transl Immunology 2017). Particularmente, la

generación de iTregs inducirían un estado anti-inflamatorio y, por consiguiente, menor capacidad citotóxica contra los agentes microbianos frecuentes en esta etapa post trasplante (Zheng, J Immunol 2002; Li, Cel, 2008; Johnston Cell Immunol 2016). Es posible que también que se vea afectada la homeostasis de las Th17, que jugarían un rol importante en la defensa contra las infecciones bacterianas extracelulares y micóticas y virales (Li Immunity 2007; Zhu, Blood 2008; Coomes, J Immunol 2010).

En este mismo sentido, resulta de interés un análisis de los eventos de bacteriemias en una serie de más de 100 trasplantes alogénicos en función de diferentes polimorfismos de citoquinas que realizó un grupo polaco. Si bien no alcanzó diferencias estadísticamente significativas, los receptores +29 CC fueron quienes más desarrollaron esta complicación infecciosa (Dukat-Mazurek, Human Immunol 2017).

El incremento cercano a 2 veces en la MLE de los pacientes portadores del genotipo +29 CC fue independiente de otros factores de riesgo. Además del genotipo +29 CC, la edad de los pacientes y, en menor medida, la de los donantes fue el otro factor de riesgo independiente para la MLE, de acuerdo con la bibliografía (Gratwohl, Lancet 1998; Gratwohl, Best Pract Res Clin Haematol 2007; Deeg, Blood 2010, Nivison-Smith, Inter Med J 2011; Pidala, Blood 2014). Esta serie incluyó trasplantes realizados entre los años 1997 y 2006, período en el cual el *score* de comorbilidades HCT-CI no había sido validado (Sorrer, Blood 2005), por ende, esta variable no pudo ser incluida en el análisis multivariado para MLE.

Sin diferencias en la tasa de recaída, el genotipo +29 del receptor resultó una variable independiente para la sobrevida global, con una reducción significativa de 1,5 veces para los receptores CC. El impacto en la SG, no observado en la serie de trasplantes alogénicos emparentados, puede deberse el mayor número de pacientes tanto en la serie completa como en el sub-grupo de trasplantes con acondicionamientos mieloablativos NR. Además, la mayor tasa de MLE tras el trasplante alogénico NR fue superior a la de los trasplantes relacionados (32% vs. 15% a 5 años) y, por ende, su posible traducción en la SG (43% vs. 51% a 5 años). Coincidente con los resultados del capítulo 1, al igual que estudios publicados con anterioridad, los otros factores de riesgo asociados a este evento fueron la edad, tanto de los pacientes como de los donantes, y el *status* de la enfermedad pre-trasplante (Woolfrey, Biol Blood Marrow Transplant 2010; Pidala, Blood 2014; Shaw, Biol Blood Marrow Transplant 2018).

### **3. Estudios funcionales**

*Los resultados mencionados previamente sugieren que el alelo C, contribuiría a un estado de inmunosupresión a partir de mayor cantidad de Tregs y, por otro lado, aumento de los fenómenos pro-fibróticos luego de la producción de colágeno por parte de los miofibroblastos. Diferentes estudios funcionales in vitro e in vivo permiten obtener ciertas conclusiones y, a la vez, abrir otros interrogantes acerca del mecanismo fisiopatológico a través del cual el SNP +29 ejercería su acción.*

La cinética de reconstitución inmune de los Tregs así como su perfil de activación juegan un rol importante en los eventos clínicos durante los primeros 30 días post trasplante hematopoyético (Li, Leuk Res 2010). En coincidencia con la cinética de TGF- $\beta$ 1, se produce un descenso transitorio durante las dos semanas post infusión de CPH para luego ascender (Laguila-Visenteiner, Exp Hematol 2003; Niu, Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2010, Coomes, Transplantation 2010). Posiblemente esto sea debido a que los Tregs son una de las fuentes principales de TGF- $\beta$ 1, mediante secreción al medio o expresión en membrana.

Li y col. tomaron muestras a 56 pacientes adultos que recibieron un trasplante alogénico luego del *engraftment* (entre la semana 2-4). Evaluaron la proporción de Tregs/CD4 totales y los niveles de TGF- $\beta$ 1 y TNF- $\alpha$ , describiendo tres hallazgos relevantes. En primer lugar, los niveles de Tregs se asociaron con la incidencia y severidad de EICHa: los pacientes con EICH aguda grado 1 y aquellos que no desarrollaron la complicación presentaron niveles de Tregs similares, mientras que, los que desarrollaron EICH GII tuvieron una reducción significativa, y aún más marcada para los que tuvieron EICH GIII-IV. En segundo lugar, los pacientes que tuvieron EICH aguda fueron aquellos que presentaron los menores niveles de TGF- $\beta$ 1, con un incremento inversamente proporcional con la severidad de la EICH aguda, contrariamente a los niveles de TNF- $\alpha$ . Por último, los niveles de TGF- $\beta$ 1 fueron directamente proporcionales a los niveles de Tregs (Li, Leuk Res 2010).

En la presente serie, la cinética de reconstitución inmune de los Tregs fue diferente según el tipo de trasplante. Se observó un retraso en la reconstitución inmune de los pacientes que recibieron ATG durante el acondicionamiento, observando un nadir hasta el día 28, con una recuperación progresiva hacia el segundo mes post trasplante, coincidente con la literatura (Bosch, Cytotherapy 2012; Baron, Haematologica 2017). Los trasplantes autólogos presentaron un incremento más temprano (día 14) para luego

descender al día 21, mientras que, el pico fue entre los días 21-28 con el descenso posterior en los trasplantes alogénicos. Si bien pudo observarse que la cinética post-estimulación *in vitro* de la expresión de TGF- $\beta$ 1 en los Tregs de individuos normales posee un pico de expresión a las 48 hs con un incremento de 3 veces el valor basal, esta observación no fue confirmada en los estudios *in vivo*. Los Tregs evaluados en pacientes trasplantados no presentaron un incremento significativo en la expresión de TGF- $\beta$ 1 en su membrana. La expresión siempre fue cercana al 1%, sin variaciones significativas en ninguno de los tiempos analizados. El ambiente inflamatorio del trasplante hematopoyético caracterizado por la “tormenta de citoquinas” durante al acondicionamiento, sobre todo mieloablativo, significó un estímulo de activación menor al generado *in vitro*.

Utilizando estudios de co-cultivos de células T efectoras con Tregs autólogos, se observó que los Tregs con genotipo +29 CC presentaron mayor capacidad inmunosupresora (CC 92% vs. TC 80% vs. TT 70%). La mayor capacidad inmunosupresora, no descrita previamente, podría ser a partir de una respuesta a la activación de los Tregs con un incremento de la secreción al medio o de la expresión en membrana de TGF- $\beta$ 1. La presencia del alelo C en la posición +29 estaría asociada a una mayor producción de TGF- $\beta$ 1, si bien existe alguna controversia al respecto (Yamada, J Bone Miner Res 1998; Awad, Transplantation 1998; Yokota, Circulation 2000; Ziv, JAMA 2001; Gewaltig, Clin Chim Acta 2002; Dunning, Cancer Res 2003; Mak, Cytokine 2007). Entre estudios descriptos que analizaron el rol del SNP +29 en el proceso de secreción de TGF- $\beta$ 1, Dunning y col., del Instituto Británico de Investigación del Cáncer, transfectaron células humanas HeLa con la variante +29 T o +29 C. Las células fueron incubadas en medios estimulados y aquellas células con la variante +29 C mostraron un incremento significativo de los niveles de TGF- $\beta$ 1 en el sobrenadante a las 12 y 18hs (Dunning, Cancer Res 2003).

Los niveles basales de TGF- $\beta$ 1, sin estimulación, en muestras de suero congeladas pre-trasplante de más de 400 receptores y donantes no resultaron determinantes para los eventos de sobrevida incluyendo la MLE y la SG. No hay trabajos publicados que hayan evaluado esta posible asociación. Por otro lado, estos niveles basales en estado quiescente, no se relacionaron a los genotipos en las posiciones +29 y +74. Dentro de las posibles razones para estos resultados se encuentra la dificultad en la técnica de medición de TGF- $\beta$ 1: las muestras fueron congeladas, descongeladas y debieron pasar por un proceso de activación mediante un cambio de



pH. Además, los hallazgos de Dunning y col. sugerirían que el estado quiescente inmunológico no pondría en evidencia el impacto de la variante polimórfica en los niveles circulantes de la citoquina.

Es posible que el efecto mediado por el SNP +29 se observe tras mecanismos estimulatorios y que el desequilibrio inmune vinculado al trasplante ponga de manifiesto su expresión diferencial y la susceptibilidad al desarrollo de las complicaciones observadas. De esta manera, se vería modificada la capacidad inmunosupresora de los Tregs con un incremento de la EICH; la capacidad antimicrobiana de las diferentes subpoblaciones linfocitarias (Th1, Th2, Th17 y CD8) con el aumento de las complicaciones infecciosas; la secreción de TGF- $\beta$ 1 por parte de las plaquetas con el síndrome de oclusión sinusoidal; y la secreción de TGF- $\beta$ 1 por parte de los monocitos en etapas tardías del trasplante con el desarrollo de EICH crónica.

# **DISCUSIÓN GENERAL**

El trasplante de CPH es un procedimiento complejo asociado a múltiples complicaciones. Las características del procedimiento, las variables clínicas e inmunogenéticas del paciente y el origen de los progenitores influyen en su resultado. La MLE, indicativa de la mortalidad relacionada al procedimiento, puede variar desde 1-2%, para ciertos trasplantes autólogos, hasta el 50%, para algunos trasplantes alogénicos con donante NR.

El trasplante autólogo es un procedimiento con una tasa de eventos significativamente menor que el trasplante alogénico (Suciu, Blood 2003). Las complicaciones surgen de la combinación de las variables clínicas del paciente, de la patología de base y su *status* pre-trasplante, y de la toxicidad del esquema de acondicionamiento.

La presencia de comorbilidades, entre las características propias del paciente, puede afectar su tolerancia a las toxicidades del procedimiento. El HCT-CI es un sistema diseñado originalmente en el contexto del trasplante alogénico que categoriza la presencia de 16 comorbilidades dividiendo los pacientes en grupos de riesgo (Sorrow, Blood 2005). Este sistema fue validado en una cohorte independiente de pacientes que recibieron un trasplante autólogo en centros representativos de población local y demostró su aplicabilidad para predecir eventos de morbilidad y mortalidad. El incremento del riesgo se tradujo en una mayor toxicidad temprana, representada por la necesidad de intubación orotraqueal, el requerimiento de vasopresores y la indicación de diálisis; así como, con un aumento proporcional de la tasa de MLE al día 100 y a largo plazo.

Otros factores inherentes al paciente, como el sexo masculino y la edad, con dos puntos de corte entre 55-64 y  $\geq 65$  años, o el linfoma como patología de base, mostraron ser variables independientes de riesgo frente a las comorbilidades para predecir la MLE. Por ende estas variables fueron combinadas en un *score* multifactorial novedoso que permite agrupar a los pacientes en cuatro categorías de riesgo: bajo, intermedio, alto y muy alto. Este sistema, que combina las características propias de cada paciente, logra predecir de manera significativa la probabilidad de desarrollar los eventos de morbilidad temprana así como la MLE: los pacientes de riesgo bajo mostraron una tasa cercana al 1% con un incremento progresivo de hasta 15 veces para los de riesgo muy alto. A su vez, se tradujo en una asociación clínica y estadísticamente significativa con la SG, con una reducción cercana al 10% para cada grupo de riesgo. Este nuevo *score* multifactorial es una herramienta que podría utilizarse para definir si un paciente es

candidato al trasplante autólogo, ajustar dosis del régimen de acondicionamiento o definir el abordaje ambulatorio del procedimiento.

Avanzando en la complejidad, el universo de factores se amplía en el trasplante alogénico. A las variables ya mencionadas se les suman las características clínicas del donante, las variables inmunogenéticas de dos individuos y, sobre todo, la histocompatibilidad entre ambos. Por lo tanto, la tasa de complicaciones es significativamente mayor que la del trasplante autólogo, con un aumento de la MLE cercano a 5 veces. Algunas de estas complicaciones son inherentes al trasplante, como el rechazo, poco frecuente pero con altísima mortalidad, y la EICH, muy frecuente y con variada morbi-mortalidad. Además, los regímenes de inmunosupresión para prevenir la aparición de estos eventos exponen al paciente a un alto riesgo de padecer infecciones, aún fuera del período de neutropenia inicial. Las variables mencionadas afectan la sobrevida a largo plazo a partir de su influencia en la mortalidad relacionada al procedimiento y asociada a la recaída de la enfermedad.

El rechazo del injerto ha sido un evento infrecuente pero grave, asociado al uso de fuente de cordón umbilical y a los regímenes de intensidad reducida. Por otro lado, la incidencia de EICH aguda se vio incrementada luego de los acondicionamientos mieloablativos, secundaria al daño tisular que generan estos regímenes y a la tormenta de citoquinas que se libera; y con la utilización de donantes NR, debido a la disparidad de antígenos de histocompatibilidad (mayores y menores). La tasa de EICH crónica se vio aumentada con la utilización de SP como fuente y prevenida mediante el uso de globulina antilinfocitaria. Estos hallazgos confirmaron los factores de riesgo ya definidos para el rechazo (Ferra, *Leuk Lymphoma* 2015; Kernan, *Blood* 1989) y la EICH (Arai, *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; Martin, *Blood* 2017; Baron, *Haematologica* 2017).

En cuanto a las variables que afectaron la sobrevida post trasplante alogénico, se confirmó la relevancia de las comorbilidades, el *status* de la enfermedad, el tipo de donante y el régimen de acondicionamiento. El uso de donantes NR y la presencia de comorbilidades fueron los factores de riesgo de mayor peso en esta serie para predecir la MLE. Los pacientes con HCT-CI riesgo intermedio y alto, al igual que, los trasplantes con donante NR estuvieron asociados con un incremento de la MLE, traduciéndose en una reducción significativa de la SG. En relación a las características de la patología de base, el factor más importante fue el *status* pre-trasplante. Aquellos pacientes

trasplantados en estadios tardíos presentaron una reducción significativa de la SLE y la SG a expensas de un incremento de la tasa de recaída.

Si bien la edad se asocia a un incremento en la MLE en numerosas series internacionales (Deeg, Blood 2010, Nivison-Smith, Inter Med J 2011; Pidala, Blood 2014), en el presente análisis de una población reducida de un único centro no se comportó como una variable independiente. Por lo tanto, se realizó un estudio multicéntrico incluyendo 137 trasplantes en pacientes mayores de 50 años realizados en Argentina. Como es habitual en este grupo etario, la mayoría de los pacientes recibió regímenes de intensidad reducida y CPH de donante histoidéntico relacionado con resultados similares a los descriptos en la literatura. En este subgrupo en particular se pudo confirmar que la presencia de comorbilidades es el factor de riesgo más importante para predecir la MLE seguido por el sexo masculino.

Más allá de los factores clínicos mencionados, existen otros factores que influyen en los resultados del trasplante alogénico, entre los que se destacan variables inmunogenéticas que pueden desempeñar una predisposición importante hacia un aumento/reducción de la respuesta inmune. Dentro de ellas TGF- $\beta$ 1 es de particular interés por sus propiedades inmunosupresora y pro-fibrótica. Se traduce como una pre-proteína, su forma madura es clivada de la porción aminoterminal que compone la proteína de latencia de la cual se separa antes de tomar contacto con el receptor. En el presente trabajo se estudiaron dos polimorfismos del gen *TGFBI* localizados en el péptido señal: los SNP c.29C>T y c.74G>C. La presencia de las variantes alteraría su proceso de secreción y, como consecuencia, los alelos +29 C y +74 G estarían asociados con una alta producción de la citoquina.

Se han publicado resultados contradictorios en relación con rol de estos polimorfismos y el trasplante hematopoyético, tanto con donante relacionado como NR, sin focalizar en el régimen de acondicionamiento, particularmente, mieloablativo. En las series aquí desarrolladas, con características étnicas y, por ende, frecuencias alélicas diferentes, el SNP +29 se asoció con diversas complicaciones post trasplante evaluando ambos tipos de donantes. Mientras que, el SNP +74 parecería no influir en este contexto.

La presencia de variantes alélicas del SNP +29 estarían asociadas a una susceptibilidad diferencial a desarrollar EICH en concordancia con el efecto dual de TGF- $\beta$ 1 en el trasplante alogénico mencionado previamente. En etapas tempranas, niveles elevados de TGF- $\beta$ 1 disminuirían el riesgo de EICH aguda gracias a un efecto

inmunosupresor, mientras que, en etapas tardías sus niveles elevados aumentarían el riesgo de EICH crónica a partir de su acción pro-fibrótica. La presencia del alelo +29 C (alto productor) en los receptores, se asoció a una reducción en la incidencia de EICH aguda y las formas clínicamente significativas con el uso de donantes histoidénticos emparentados (subgrupo de trasplantes con acondicionamientos mieloablativos) y no emparentados. El genotipo de los donantes influyó únicamente en los trasplantes relacionados mieloablativos en quienes la presencia del alelo C se vinculó con una tendencia a menor EICH aguda y sus formas clínicamente significativas. Por otro lado, el alelo C en los donantes se asoció con un incremento significativo e independiente de las formas extensas de la EICH crónica. A su vez, y como consecuencia de la mayor incidencia de EICH crónica extenso y su relación con el efecto injerto *vs.* leucemia, los donantes con alelo C mostraron una reducción significativa en la tasa de recaída traduciéndose en un incremento en la SG. La susceptibilidad al desarrollo de estas complicaciones no fue evidente en la serie de trasplantes NR posiblemente debido al uso casi universal de depleción linfocitaria del injerto con alentuzumab. Esta medida modularía potenciales efectos biológicos de variantes polimórficas en genes de citoquinas de los donantes.

Además, los pacientes +29 CC tendrían un mayor riesgo de MLE luego del trasplante con acondicionamientos mieloablativos, tanto con donantes relacionados como NR. La presencia del genotipo alto productor como factor de riesgo de mortalidad asociada al procedimiento fue independiente de otras variables clínicas analizadas, como la edad o el sexo de pacientes o de sus donantes, la patología de base y su *status*, así como, de las comorbilidades. El incremento de la tasa de MLE se tradujo en una reducción significativa de la SG en los trasplantes con donante no emparentado, posiblemente vinculado con la mayor tasa de MLE inherente al origen de los progenitores y, en particular, al tamaño de la serie evaluada.

Se pudo observar que la cinética de reconstitución inmune es diferente de acuerdo al procedimiento realizado y que los Tregs no varían significativamente su nivel de expresión de TGF- $\beta$ 1 en membrana durante el período post-trasplante. Sin embargo, tras una estimulación *in vitro*, la cinética de expresión muestra un pico a las 48-72hs. Si bien los niveles plasmáticos de la citoquina en función de los genotipos fueron similares en estado quiescente, los Tregs +29 CC mostraron mayor capacidad supresora *in vitro*. De acuerdo con Dunning y col., es posible entonces que el efecto mediado por los genotipos en los Tregs quede evidenciado luego de estímulos de

activación y que la presencia de variantes polimórficas asociadas a la expresión diferencial TGF- $\beta$ 1 colabore en el desbalance inmune propio del procedimiento (Dunning, Cancer Res 2003).

En nuestro país, según datos del INCUCAI, se realizan cerca de 1000 trasplantes de CPH al año, de los cuales el 65% son trasplantes autólogos. Si se considera una tasa de MLE a 3 años del 5%, esto implicaría que 32 pacientes fallecen anualmente a causa del procedimiento. Esta cifra ascendería a 105 en el caso de los trasplantes alogénicos ya que la MLE alejada es del 27%. Aunque las indicaciones de trasplante, tanto autólogo como alogénico, de acuerdo a las patologías de base se encuentran mayoritariamente consensuadas, es mandatorio conocer las variables que se asocian con el incremento de la mortalidad relacionada al procedimiento. Los sistemas de predicción de riesgo permiten ajustar, de manera personalizada, los esquemas de acondicionamiento y, en el caso del trasplante alogénico, una adecuada selección de los potenciales donantes. Además, el procedimiento sería eventualmente desaconsejado en los casos de muy alto riesgo según el nuevo *score* multifactorial para trasplante autólogo. De un modo similar sería conveniente excluir del trasplante alogénico a pacientes de edad avanzada con elevado HCT-CI sin donante histoiéntico relacionado.

Desde la perspectiva de la inmunogenética, así como el alelo +29 C del gen *TGFBI* predispone a un mayor riesgo de MLE luego del uso de acondicionamientos mieloablativos, otros polimorfismos en genes de citoquinas y quimiocinas se asocian con diferentes eventos desfavorables (Dickinson, Immunogenetics 2015). La inclusión del análisis de estas variantes, además del HLA en los estudios pre trasplante, permitiría mejorar los criterios de selección, adaptar la intensidad de los regímenes de acondicionamiento o inmunosupresión y, posiblemente, desarrollar terapias dirigidas.

# **CONCLUSIONES**



En el presente trabajo se analizó el impacto de variables clínicas en los resultados de diferentes escenarios del trasplante de CPH autólogo y alogénico en distintas poblaciones. Además se estudió la influencia de polimorfismos del gen *TGFBI* sobre los eventos clínicos post trasplante alogénico con donante relacionado y NR, y si estos efectos fueron independientes de las variables clínicas estudiadas previamente. Por último, se realizó un abordaje experimental con el objetivo de determinar la influencia de estos polimorfismos sobre la funcionalidad de TGF- $\beta$ 1.

### **VARIABLES CLÍNICAS EN EL TRASPLANTE AUTÓLOGO**

- El *score* HCT-CI, validado en una cohorte de 1730 trasplantes provenientes de diferentes centros argentinos representativos de la población local, fue útil para predecir la morbi-mortalidad:
  - Los tres eventos de morbilidad temprana evaluados (ARM, vasopresores y diálisis) se vieron incrementados de manera proporcional con el HCT-CI.
  - Los pacientes con HCT-CI de riesgo alto triplicaron la tasa de MLE temprana y tardía en comparación con el riesgo intermedio y bajo.
- El nuevo sistema de puntaje multifactorial desarrollado combinó la edad, el sexo, la patología de base y el HCT-CI:
  - Este sistema permitió categorizar a los pacientes en 4 grupos con riesgos proporcionales de manifestar un evento de morbilidad y de MLE temprana.
  - La probabilidad de MLE a largo plazo, considerando como referencia al nuevo grupo de riesgo bajo, se incrementó 2,2 veces para el riesgo intermedio, 6,4 veces para el alto y 14 veces para el muy alto.
  - Consecuentemente la probabilidad de SG se vio reducida de manera proporcional: 1,4 veces para el riesgo intermedio, 2,5 veces para el alto y 3,9 veces para el muy alto.

### **VARIABLES CLÍNICAS EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO**

- La incidencia de EICH aguda GII-IV se vio incrementada con el uso de regímenes mieloablativos (37% vs. 24%) y de donantes NR (45% vs. 26%).

- La incidencia de EICH crónica se acrecentó con la utilización de sangre periférica como fuente, mientras que, se redujó con la utilización de depleción linfocitaria *in vivo* (donantes NR).
- Los dos factores de riesgo más relevantes para la MLE fueron el uso de donantes NR (riesgo aumentado de 2,6 veces) y el HCT-CI  $\geq 3$  (riesgo acrecentado de 3,1 veces).
- El factor determinante para predecir la recaída fue el *status* de la enfermedad, con un riesgo de 2,4 veces para los estadios avanzados.
- La SG se vio independientemente afectada por el uso de donantes NR (riesgo de 1,8), un HCT-CI  $\geq 3$  (riesgo de 2,1) y un estadio avanzado de la enfermedad (riesgo de 1,9).
- La presencia de comorbilidades fue el factor determinante en la MLE de los pacientes mayores, con un riesgo de 2 veces para los individuos con HCT-CI  $\geq 1$ .

#### **Evaluación del impacto de los polimorfismos funcionales del gen *TGFBI* en el trasplante alogénico**

- El genotipo +29 del gen *TGFBI* se asoció con diferentes eventos post trasplante alogénico tanto en la cohorte de trasplantes relacionados como en los no relacionados, especialmente en aquellos que recibieron un acondicionamiento mieloablativo.
- Los pacientes +29 CC presentaron una reducción significativa del EICH aguda, particularmente, de los grados II-IV, tanto en la cohorte de trasplantes relacionados mieloablativos (riesgo de 5,6 y 5,5, respectivamente) como en los no relacionados (1,5 y 2,1 respectivamente).
- El genotipo del donante no influyó en el trasplante NR en los que se utilizó casi universalmente depleción linfocitaria. Sin embargo, en los relacionados, el alelo +29 C se asoció con una tendencia a menor EICH aguda, con un incremento significativo de las formas extensas del EICH crónica y una reducción del riesgo de recaída (2,4 veces mayor para los donantes +29 TT).
- Los pacientes +29 CC que recibieron acondicionamientos mieloablativos acrecentaron la tasa de MLE, tanto en los alogénico relacionado (4 veces mayor) como en los NR (2 veces mayor). En este último grupo el genotipo también se comportó como un factor de riesgo independiente para la SG (aumento del riesgo de mortalidad de 1,5 veces).

- El genotipo +74 del gen *TGFBI* no se asoció con ningún evento clínico estudiado.
- En muestras de pacientes tomadas post *engraftment* se observó que la cinética de la reconstitución inmune de los Tregs depende del procedimiento, con un pico en los días +14 para el autólogo y +21-28 para el alogénico. Estos Tregs no presentaron variaciones significativas en la expresión de TGF-β1 en membrana.
- No se evidenciaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de TGF-β1 en función del SNP +29 ni +74 en muestras en estado quiescente provenientes de pacientes y de sus donantes.
- Los Tregs estimuladas *in vitro* aumentaron la expresión en membrana de TGF-β1 (pico de expresión 48-72hs). Por otro lado, los Tregs +29 CC mostraron mayor capacidad inmunosupresora (CC 92% vs. TC 80% vs. TT 70%).

## Conclusión General

El trasplante hematopoyético es una herramienta con potencial curativo para diferentes patologías oncohematológicas y no oncohematológicas. Su práctica no está exenta de complicaciones, las cuales dependen, en parte, de los factores inherentes del procedimiento, del origen de las CPH y, en gran medida, de las características propias del paciente. La lista de factores de riesgo que pueden afectar los resultados del trasplante es extensa. Se destacan la presencia de comorbilidades, la edad, el sexo y las características de la enfermedad de base, sumado al tipo de donante, en el caso del trasplante alogénico, como los principales predictores de sobrevida a largo plazo. Más allá de estas variables clínicas, factores inmunogenéticos como, por ejemplo, los polimorfismos del gen de *TGFBI*, particularmente el SNP c.29C>T, muestran un rol importante en este escenario.

La tasa de MLE es indicativa de la mortalidad relacionada al procedimiento. La misma es menor al 1% en pacientes jóvenes y sin comorbilidades que se someten a un trasplante autólogo por MM, y aumenta a un 50% en pacientes mayores con comorbilidades o portadores del genotipo +29 CC del gen *TGFBI* que reciben un trasplante alogénico NR. Estos hallazgos pueden ayudar a una mejor selección de los pacientes y de sus donantes, así como a definir estrategias de acondicionamiento e inmunosupresión adaptadas al riesgo individual con el objetivo de disminuir los índices de morbi-mortalidad asociados al procedimiento.

# **BIBLIOGRAFIA**

1. Alegre A, Diaz Mediavilla J, San-Miguel J, et al. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma: a report of 259 cases from the Spanish Registry. *Bone Marrow Transplant.* 1998;21:133-40.
2. Allareddy V, Roy A, Rampa S, et al. Outcomes of stem cell transplant patients with acute respiratory failure requiring mechanical ventilation in the United States. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49:1278-86.
3. Alyea EP, Kim HT, Ho V, et al. Comparative outcome of nonmyeloablative and myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for patients older than 50 years of age. *Blood.* 2005;105:1810-4.
4. Alousi AM, Le-Rademacher J, Saliba RM, et al. Who is the better donor for older hematopoietic transplant recipients: an older-aged sibling or a young, matched unrelated volunteer? *Blood* 2013;121:2567-73.
5. Amani D, Farjadian S, Ghaderi A. The frequency of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms in a normal southern Iranian population. *Int J Immunogenet.* 2008;35:145-51.
6. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci.* 2003;116:217-24.
7. Anscher MS, Peters WP, Reisenbichler H, et al. Transforming growth factor beta as a predictor of liver and lung fibrosis after autologous bone marrow transplantation for advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 1993;328:1592-8.
8. Aoudjhane M, Labopin A, Gorin NC, et al. Comparative outcome of reduced intensity and myeloablative conditioning regimen in HLA identical sibling allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for patients older than 50 years of age with acute myeloblastic leukaemia: a retrospective survey from the Acute Leukemia Working Party (ALWP) of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Leukemia* 2005;19:2304-12.
9. Appelbaum F. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *N Engl J Med.* 2007;375:1472-5.
10. Appelbaum FR, Herzog GP, Ziegler JL, et al. Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphomas. *Blood.* 1978;52:5285-95.
11. Arai S, Arora M, Wang T, et al. Increasing incidence of chronic graft-versus-host disease in allogeneic transplantation: a report from the center for international blood and marrow transplant research. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21:266-74.
12. Armand P, Gibson C, Cutler C, et al. A disease risk index for patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2012;120:905-13.
13. Armand P, Kim H, Logan B, et al. Validation and refinement of the disease risk index for allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2014;123:3664-71.
14. Arora M. Therapy of chronic graft-versus-host disease. *Bet Pract Res Clin Haematol.* 2008;21:271-9.
15. Arrieta-Bolaños E, Madrigal A, Shaw B. Transforming growth factor-β1 polymorphisms and the outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Immunogenet.* 2012;39:192-202.
16. Arrieta-Bolaños E, Mayor N, Marsh SGE, et al. Polymorphism in TGFB1 is associated with worse non-relapse mortality and overall survival after stem cell transplantation with unrelated donors. *Haematologica.* 2016;101:382-90.
17. Aschan J. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: conditioning. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007;20:295-310.
18. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, et al. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem.* 1983;258:7155-60.
19. Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, et al. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation.* 1998;66:1014-20.
20. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15:1628-33.
21. Banovic T, MacDonald K, Morris E, et al. TGF-β in allogeneic stem cell transplantation: friend or foe. *Blood.* 2005;106:2206-14.

22. Barba P, Piñama JL, Martino R, et al. Comparison of two pretransplant predictive model and a flexible HCT-CI using different cut off points to determine low-, intermediate-, and high-risk groups: the flexible HCT-CI Is the best predictor of NRM and OS in a population of patients undergoing allo-RIC. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16:413-20.
23. Baron F, Maris M, Sandmaier B, et al. Graft-vs-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol* 2005;23:1993-2003. .
24. Baron F, Mohty M, Didier B, et al. Anti-thymocyte globulin as graft-versus-host disease prevention in the setting of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: a review from the acute leukemia working party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica.* 2017;102:224-34.
25. Baron C, Somogyi R, Geller LD, et al. Prediction of graft-versus-host disease in humans by donor gene-expression profiling. *PLoS Med.* 2007;4:e23.
26. Baron F y Storb R. Hematopoietic cell transplantation after reduced-intensity conditioning for older adults with acute myeloid leukemia in complete remission. *Curr Opin Hematol* 2007;14:145-51.
27. Barrett A y Battiwalla M. Relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol.* 2010;3:429-41.
28. Bouche D y Marie J. Transforming growth factor  $\beta$ : a master regulator of the gut microbiota and immune cell interactions. *Clin Transl Immunology.* 2017. Doi:10.1038/cti.2017.9.
29. Bayraktar U y Nates J. Intensive care outcomes in adult hematopoietic stem cell transplantation patients. *World J Clin Oncol.* 2016;7:98-105.
30. Bearman S, Appelbaum F, Buckner D, et al. Regimen-related toxicity in patients undergoing bone marrow transplantation. *J Clin Oncol.* 1988;6:1562-8.
31. Bensinger W. Allogeneic transplantation: peripheral blood versus bone marrow. *Curr Opin Oncol.* 2012;24:191-6.
32. Berndt SI, Huang WY, Chatterjee N, et al. Transforming growth factor beta 1 (TGFB1) gene polymorphisms and risk of advanced colorectal adenoma. *Carcinogenesis.* 2007;28:1965-70.
33. Beutler E. The treatment of acute leukemia: past, present and future. *Leukemia.* 2001;15:558-661.
34. Bierman P, Lynch J, Bociek R, et al. The international prognostic factors project score for advanced Hodgkin's disease is useful for predicting outcome of autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Oncol.* 2002;13:1370-7.
35. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect;*19676221-78.
36. Bitran J, Klein L, Link D, et al. High-dose myeloablative therapy and autologous peripheral blood progenitor cell transplantation for elderly patients (greater than 65 years of age) with relapsed large cell lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003;9:383-8.
37. Bjorklund A, Aschan J, Labopin M, et al. Risk factors for fatal infectious complications developing late after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007;40:1055-67.
38. Globe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 2000 May 4;342:1350-8.
39. Bommireddy R y Doetschman T. TGFbeta1 and Treg cells: alliance for tolerance. *Trends Mol Med.* 2007;13:492-501.
40. Boratynska M y Patrzalek D. Transplantology: challenges for today. *Arch Immunol Ther Exp,* 2016;64:S37-S45.
41. Bosch M, Dhadda M, Hoegh-Petersen M, et al. *Cytotherapy* 2012;14:1258-75.
42. Boyaci N, Aygeneci G, Turkoglu M, et al. The intensive care management process in patients with hematopoietic stem cell transplantation and factor affecting their prognosis. *Hematology.* 2014;19:338-45.
43. Carli C, Giroux M y Delisle J. Roles of transforming growth factor- $\beta$ in graft-versus-host and graft-versus-tumor effects. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18:1329-40.

44. Cassileth PA, Harrington, DP, Appelbaum FR, et al. Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. *N Engl J Med.* 1998;339:1649-56.
45. Cavet J, Dickinson A, Norden J, et al. Interferon- $\gamma$  and inteleukin-6 gene polymorphism associated with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Blood.* 2001;98:1594-1600.
46. Cavins J, Djerassi I, Roy A, et al. Preservation of viable human granulocytes at low temperature in dimethyl sulfoxide. *Criobiology.* 1965;2:129-33.
47. Chang L, Frame D, Braun T, et al. Engraftment Syndrome following allogeneic hematopoietic cell transplantation predicts poor outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20:1407-17.
48. Chen Y, Lane A, Logan B, et al. Impact of conditioning régime on n outcomes for patients with Lymphoma undergoing high-dose therapy with autologous hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21:1046-53.
49. Cheng Yh, Xu Lp, Liu Dh, et al. Comparative outcomes between cord blood transplantation and bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation from unrelated donors in patients with hematologic malignancies: a single-institute analysis. *Chin Med Journal.* 2013;126:2499-503.
50. Chien J, Zhang X, Fan W, et al. Evaluation of published single nucleotide polymorphism associated with acute GVHD. *Blood* 2012;119:5311-9.
51. Cheuning J, Castro-Malaspina H, Jakuhowski A, et al. Fludarabine-based conditioning secures engraftment of second hematopoietic stem cell allografts (HSCT) in the treatment of initial graft failure. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13:1313-23.
52. Chiara D, Izutsu K, Kondo E, et al. High-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation in elderly patients with relapse/refractory diffuse large B cell lymphoma: a nationwide retrospective study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20:684-9.
53. Ciurea S, Thall P, Wang X, et al. Donor-specific anti-HLA Abs and graft failure in matched unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2011;118:5957-64.
54. Ciurea S, Zhang M, Bacigalupo A, et al. Haploidentical transplant with posttransplant cyclophosphamide vs matched unrelated donor transplant for acute myeloid leukemia. *Blood.* 2015;126:1033-40.
55. Cluzeau T, Lambert J, Raus N, et al. Risk factor and outcome of graft failure after HLA match and mismatched unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation: a study on behalf of SFGM-TC and SFHI. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51:687-91.
56. Coghil JM, Sarantopoulos S, Moran TP, et al. Effector CD4+ T cells, the cytokines they generate, and GVHD: something old and something new. *Blood.* 2011;117:3268-76.
57. Confer D, Abress L, Willis Navarro, et al. Selection of adult unrelated hematopoietic cell donor: beyond HLA. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16:S8-S11.
58. Congdon C. Experimental treatment of total-body irradiation injury: a brief review. *Blood.* 1957;12:746-54.
59. Coomes S y Moore B. Pleiotropic effects of transforming growths factor- $\beta$  in hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation.* 2010;90:1139-44.
60. Coomes S, Wilke C, Moore T, et al. Induction of TGF- $\beta$ 1, not regulatory T cell, impairs antiviral immunity in the lng following bone marrow transplantat. *J immunol* 2010;184:5130-40.
61. Copelan E. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl j Med.* 2006;354:1813-26.
62. Couriel D, Caldera H, Champlin R, et al. Acute Graft-versus-Host Disease: Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Cancer.* 2004;101:1936-46.
63. Couriel D, Salika R, Giralt S, et al. Acute and chronic graft-versus-host disease after ablative and nonmyeloablative conditioning for allogeneic hematopoietic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004;10:178-85.
64. Cox D. Regression models and life tables. *J. R. Statit. Soc.* 1972;34:187-220.
65. Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol.* 1958;20:156-66.
66. Davies S, Kollman C, Anasetti C, et al. Engraftment and survival after unrelated-donor bone marrow transplantation: a report from the National Marrow Donor Program. *Blood.* 2000;96:4096-102.

67. Davis BD. The mechanism of protein secretion across membranes. *Nature*. 1980;283:433-8.
68. Deeg J y Sandmaier B. Who is fit for allogeneic transplantation? *Blood*. 2010;116:4762-70.
69. DeFilipp Z y Chen Y. Strategies and challenges for pharmacological maintenance therapies after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22:2134-40.
70. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, et al. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature*. 1985;316:701-5.
71. Devetten MP y Vose JM. Graft-versus-Host Disease: How to Translate New Insights into New Therapeutic Strategies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2004;10:815-25.
72. Dickinson AM y Norden J. Non-HLA genomics: does it have a role in predicting haematopoietic stem cell transplantation outcome? *Immunogenetics*. 2015;42:229-38.
73. D'Souza A, Zhu X. Current Uses and Outcomes of Hematopoietic Cell Transplantation (HCT): CIBMTR Summary Slides, 2016. Available at: [http://www.ciBone Marrow Transplantr.org](http://www.ciBoneMarrowTransplantr.org).
74. Du J, Paz K, Flynn R, et al. Pirfenidone ameliorates murine chronic GVHD through inhibition of macrophage infiltration and TGF- $\beta$  production. *Blood*. 2017;129:2570-80.
75. Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, et al. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem*. 1995;270:10618-24.
76. Dukat-Mazurek A, Bleniaszewska M, Hellmann A et al. Association of cytokine gene polymorphism with the complications of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Hum Immunol*. 2017;78:672-83.
77. Dunning AM, Ellis PD, McBride S, et al. A transforming growth factorbeta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. *Cancer Res*. 2003 May 15;63:2610-5.
78. Ellison C, Lissitsyn Y, Gheorghiu L, et al. Immunomodulatory effects of palifermin (recombinant human keratinocyte growth factor) in an SLE-like model of chronic graft-versus-host disease. *Scan J immunol* 2012;75:69-76.
79. Ensembl [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation)
80. Estey E, de Lima M, Tibes R, et al. Prospective feasibility analysis of reduced-intensity conditioning (RIC) regimens for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in elderly patients with acute myeloid leukemia (AML) and high-risk myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood* 2007;109:1395-400.
81. Ferra C, Sanz J, Diaz-Perez M, et al. Outcome of graft failure after allogeneic stem cell transplant: study of 89 patients. *Leuk Lymphoma*. 2015;56:656-62.
82. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, et al. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009;373:1550-61.
83. Ferrara J, Harris A, Greenson J, et al. Regenerative islet-derived 3-alfa is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood*. 2011;118:6702-08.
84. Festuccia M, Deeg H, Gooley T, et al. Minimal identifiable disease and the role of conditioning intensity in hematopoietic cell transplantation for myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia evolving from myelodysplastic syndrome. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22:1227-33.
85. 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;12:945-56.
86. Fine J y Gray R. A proportional hazard model for the subdistribution of a competing risk. *J Am Stat Assoc*. 1999;94:496-509.
87. Finke J y Nagle A. Viewpoint: What is the role of allogeneic hematopoietic cell transplantation in the era of reduced-intensity conditioning – is there still an upper age limit? A focus on myeloid neoplasia. *Leukemia*. 2007;21:1357-62.
88. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, et al. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood*. 2004;104:1923-30.
89. Foroozfar N, Hobbs JR, Hugh-Jones K, et al. Bone-marrow transplant from an unrelated donor for chronic granulomatous disease. *Lancet*. 1977;309:210-3.



90. Garciaz S, Coso D, Schiano de Collella J-M, et al. Bendamustine conditioning for non\_hodgkin lymphoma autologous transplantation: an increasing risk for renal toxicity. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51:319-21.
91. Ge Y, Wu R, Lu T, et al. Combined effects of TGFB1 +869T/C and +915 G/C polymorphisms on acute rejection risk in solid organ transplant recipients: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9:e93938.doi:10.1371
92. Gewaltig J, Mangasser-Stephan K, Gartung C, et al. Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. *Clin Chim Acta.* 2002;316:83-94.
93. Ghafoory S, Varshney R, Robinson T, et al. Platelet TGF- $\beta$ 1 deficiency decrease liver fibrosis in a mouse model of liver injury. *Blood Advances.* 2018;2:470-80.
94. Giroux M, Delisle J, Gauthier S, et al. SMAD3 prevents graft-versus-host disease by restraining Th1 differentiation and granulocytemediated tissue damage. *Blood.* 2011;117:1734-44.
95. GLuckman E, Broxmeyer H, AuerbachA, 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;321:1174-78.
96. 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.
97. Gooley T, Chien J, Perman S, et al. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic –cell transplantation. *N Engl J Med.* 2010;353:2091-101.
98. Graf S, Vaughn J, Cauncey T, et al. Comorbidities, alcohol use disorder, and age predict outcomes after autologous hematopoietic cell transplantation for lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22:1582-7.
99. Grainger D, Heathcote K, Chiano M, et al. Genetic control of circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet.* 1999;8:93-7.
100. Ostgard LS, Lund J, Norgaard J, et al. Impact of allogeneic stem cell transplantation in first complete remission in acute myeloid leukemia: a national population-based cohort study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2018;24:314-23.
101. Gratwohl A. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007 Jun;20:119-24
102. Gratwohl A, Baldomero H, Frauendorfer K, et al. Results of the EBMT activity survey 2005 on haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39:71-87.
103. Gratwohl A, Baldomero H, Schmid O, et al. Change in the stem cell source for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in Europe: a report of the EBMT activity survey 2003. *Bone Marrow Transplant.* 2005;36:575-90.
104. Gratwohl A, Hermans J, Goldman J, et al. Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. *Lancet.* 1998;352:1087-92.
105. Gray R. A class of k-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *Ann Stat.* 1988;16:1141-54.
106. Gyurkocza B y Sandmaier B. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood.* 2014;124:344-53.
107. Hansen JA, Clift RA, Thomas ED, et al. Transplantation of marrow from an unrelated donor to a patient with acute leukemia. *N Engl J Med.* 1980;303:565-70.
108. Hattori H, Matsuzaki A, Suminoe A, et al. Polymorphisms of transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta1 type II receptor genes are associated with acute graft-versus-host disease in children with HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002;30:665-71.
109. Hess AD. Modulation of Graft-versus-Host Disease: Role of Regulatory T Lymphocytes. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12:13-22.
110. Hill G y Ferrara J. The primacy of the gastrointestinal tract as target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 2000;95:2754-9.

111. Hiraoka A, Ohashi Y, Okamoto S, et al. Phase II study comparing tacrolimus (FK506) with cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:181-5.
112. Ho VT, Revta C y Richardson P. Hepatic veno-occlusive disease after hematopoietic stem cell transplantation: update on defibrotide and other current investigational therapies. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41:229-37.
113. Horowitz MM, Przepiorka D, Bartels P, et al. Tacrolimus vs. cyclosporine immunosuppression: results in advanced-stage disease compared with historical controls treated exclusively with cyclosporine. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1999;5:180-6.
114. Hu HH, Chen DQ, Wang YN, et al. New insights into TGF- $\beta$ /Smad signaling in tissue fibrosis. *Chem Biol Interact*. 2018;292:76-83.
115. Inamoto Y, Flowers M, Appelbaum F, et al. A retrospective comparison of tacrolimus versus cyclosporine with methotrexate for immunosuppression after allogeneic hematopoietic cell transplantation with mobilized blood cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:1088-92.
116. Jaglowski S, Ruppert A, Hofmeister C, et al. The Hematopoietic Stem Cell Transplant Comorbidity Index (HCT.CI) can predict for 30-day readmission following autologous stem cell transplant for lymphoma and multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;49:1323-9.
117. Jantunen E, Canals C, Rambaldi A, et al. Autologous stem cell transplantation in elderly patients ( $\geq 60$  years) with diffuse large B-cell lymphoma: an analysis based on data in the European Blood and Marrow Transplantation registry. *Haematologica*. 2008;93:1837-942.
118. Johnston C, Smyth D, Dresser d, et al. TGF- $\beta$ 1 in tolerance, development and regulation of immunity. *Cell Immunol*. 2016;299:14-22.
119. Kako S, Izutsu K, Kato K, et al. The role of hematopoietic stem cell transplantation for relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *Am J Hematol*. 2015;90:132-8.
120. Kamel A, Gameel A, Ebid G, et al. The impact of cytokine gene polymorphism on the outcome of HLA matched sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Cytokine*. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.05.003>.
121. Kanakry C, Fuchs E and Luznik L. Modern approaches to HLA-haploidentical blood or marrow transplantation. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13:10-24.
122. Kanate A, Mussetti A, Kharfan-Dabaja M, et al. Reduced-intensity transplantation for lymphomas using haploidentical related donors vs HLA-matched unrelated donors. *Blood*. 2016;127:938-47.
123. Kanda J, Lopez R and Rizzieri D. Alemtuzumab for the prevention and treatment of graft-versus-host disease. *Int J Hematol*. 2011;93:586-93.
124. Kaplan E y Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *JSTOR*. 1958;53:457-81.
125. Kaplan DH, Anderson BE, McNiff JM, al. Target antigens determine graft-versus-host disease phenotype. *J Immunol*. 2004;173:5467-75.
126. Karam C, Beauchet A, Czemichow S, et al. Trends in cardiovascular disease risk factor prevalence and estimated 10-year cardiovascular risk score in a large untreated French urban population: the CARVAR 92 study. *PlosOne*. 2015;10:e0124817.
127. Keen LJ, DeFor TE, Bidwell JL, et al. Interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha region haplotypes predict transplant-related mortality after unrelated donor stem cell transplantation. *Blood*. 2004;103:3599-602.
128. Kekre N, Mak K, Stopsack K, et al. Impact of HLA-mismatch in unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation: a meta-analysis. *Am J Hematol*. 2016;91:551-5.
129. Kernan N, Bordignon C, Heller G, et al. Graft failure after T-cell-depleted human leukocyte antigen identical marrow transplant for leukemia: I. Analysis of risk factors and results of secondary transplant. *Blood*. 1989;74:2227-36.
130. Khassawneh B, White P, Anaissie, et al. Outcome from mechanical ventilation after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Chest*. 2002;121:185-8.

131. Kim H, Zhang M, Woolfrey, et al. Donor and recipient sex in allogeneic stem cell transplantation: what really matters. *Haematologica*. 2016;101:1260-6.
132. Kogon A y Hingorani S. Acute kidney injury in hematopoietic cell transplantation. *Semin Nephrol*. 2010;30:615-26.
133. Koreth J, Aldridge J, Haesook T, et al. Reduced-intensity conditioning hematopoietic stem cell transplantation in patients over 60 years: hematologic malignancy outcomes are not impaired in advanced age. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:792-800.
134. Koreth J, Pidala J, Perez W, et al. Role of reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in older patients with de novo myelodysplastic syndromes: an international collaborative decision analysis. *J Clin Oncol* 2013;31:2662-71.
135. Kruskal W y Wallis A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Am Stat Assoc*. 1952;47:583-621.
136. Kurnick NB. Autologous and isologous bone marrow storage and infusion in the treatment of myelo-suppression. *Transfusion*. 1962;2:178-87.
137. Kyrz-Krzemien S, Helbig G, Zielinska P, et al. The kinetics of nRNA transforming growth factor beta1 expression and its serum concentration in graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemias. *Med Sci Monit* 2011;17:322-8.
138. Labonte L, Iqbal T, Zaidi X, et al. Utility of comorbidity assesment in predicting the transplantation-related toxicity following autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14:1039-44.
139. Laguila Visenteiner J, Rocha Lieber S, Lopes Persoli L, et al. Relationship between cytokine gene polymorphism and graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation in a Brazilian population. *Cytokine*. 2005;32:171-7.
140. Laguila Visenteiner J, Rocha Lieber S, Lopes Persoli L, et al. Serum cytokine levels and acute graft-versus-host disease after HLA/identical hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2003;31:1044-50.
141. Leffell MS, Vogelsang GB, Lucas DP, et al. Association between TGF-beta expression and severe GVHD in allogeneic bone marrow transplantation. *Transplant Proc*. 2001;33:485-6.
142. Lerner R, Thomas W, DeFor T, et al. The international prognostic index assessed at relapse predicts outcomes of autologous transplantation for diffuse large-cell non-Hodgkin lymphoma in second complete or partial remission. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13:486-92.
143. Letterio JJ. TGF-beta signaling in T cells: roles in lymphoid and epithelial neoplasia. *Oncogene*. 2005;24:5701-12.
144. Levi F, Lucchin F, Negri E, et al. Trends in mortality from leukemia in subsequent age groups. *Leukemia*. 2000;14:1980-5.
145. Li J, Chen S, Xiao X, et al. IL-9 and Th9 cells in health and disease-From tolerance to immunopathology. *Cytokine Growth factor Rev*. 2017;37:47-55.
146. Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity*. 2007;26:579-91.
147. Li MO y Flavell RA. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell*. 2008;134:392-404.
148. Li Q, Zhai Z, Xu X, et al. Decrease of CD4+CD25+ regulatory T cells and TGF-β at early immune reconstitution is associated to the onset and severity of graft-versus-host disease following allogeneic haematogenesis stem cell trasplantation. *Leukemia Research*. 2010;34:1158-68.
149. Liem L, Fibbe W, van Houwelingen H, et al. Serum transforming growth factor-beta 1 levels in bone marrow transplant recipients correlate with blood cell counts and chronic graft-versus-host disease. *Transplantation* 1999;67:59-65.
150. Lin MT, Storer B, Martin PJ, et al.. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2003;349:2201-10.
151. Loren A, Buni G, Boudreau C, et al. Impact of donor and recipient sex and parity on outcomes of HLA-identical sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12:758-69.

152. Lorenz E, Congdon C y Uphoff D. Modification of acute injury in mice and guinea-pigs by bone marrow injections. *Radiation*. 1952;58:863-77.
153. Lucey M, Terrault N, Ojo L, et al. Long-term management of the success adult liver transplant: 2012 practice guidelines by the American association for the study of liver diseases and the American society of transplantation. *Liver Transpl*. 2013;19:3-26.
154. Ludwig H, Durie B, Bolejack V, et al. Myeloma in patients younger than age 50 years presents with more favorable features and shows better survival: an analysis of 10549 patients from the International Myeloma Working Party. *Blood*. 2008;111:4039-47.
155. Luznik L, Jalla S, Engstrom L, et al. Durable engraftment of major histocompatibility complex-incompatible cell after nonmyeloablative conditioning with fludarabine, low-dose total body irradiation, and posttransplantation cyclophosphamide. *Blood*. 2001;98:3456-64.
156. MacDonald K, Betts B, Couriel D. Emerging therapeutics for the control of chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24:19-26.
157. Majhail N, Farnia S, Carpenter P, et al. Indications for autologous and allogeneic hematopoietic cell transplantation: guidelines from the American society for blood and marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21:1863-9.
158. Mak JC, Leung HC, Sham AS, et al. Genetic polymorphisms and plasma levels of transforming growth factor-beta(1) in Chinese patients with tuberculosis in Hong Kong. *Cytokine*. 2007;40:177-82.
159. Mannick J, Lochte H, Ashley H, et al. Autografts of bone marrow in dogs after lethal total body radiation. *Blood*. 1960;15:255-66.
160. Markey K, MacDonald K y Hill G. Biology of graft-versus-host disease: experimental systems instructing clinical practice. *Blood*. 2014;124:354-62.
161. Martin P, Levine D, Storer B, et al. Genome-wide minor histocompatibility matching as related to the risk of graft-versus-host disease. *Blood*. 2017;129:791-8.
162. Martínez C, As J, Pereira A, et al. Comorbidities, not age, are predictive of survival after autologous hematopoietic cell transplantation for relapsed/refractory Hodgkin lymphoma in patients older than 50 years. *Ann Hematol*. 2017;96:9-16.
163. Maynard SJ. *Evolutionary Genetics*. Segunda edición. New York, Oxford University Press, 1998.
164. Mayor N, Saw B, Hughes D, et al. Single Nucleotide Polymorphisms in the NOD2/CARD15 gene are associated with an increase risk of relapse and death for patients with acute leukemia after hematopoietic stem-cell transplantation with unrelated donors. *J Clin Oncol*. 2007;25:4262-9.
165. McCurdy S, Kasamon Y, Kanakry C, et al. Comparable composite endpoints after HLA-match and HLA-haploidentical transplantation with post-transplantation cyclophosphamide. *Haematologica*. 2017;102:391-400.
166. McDonald G. How I treat acute graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract and the liver. *Blood*. 2016;127:1544-50.
167. McFarland W, Granville NB and Dameshek W. Autologous bone marrow infusion as an adjunct in therapy of malignant disease. *Blood*. 1959;14:503-21.
168. Melenhorst JJ, Tian X, Xu D, et al. Cytopenia and leukocyte recovery shape cytokine fluctuation after myeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2012;97:867-73.
169. Meng X, Nikolic-Paerson D y Lan H. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12:325-38.
170. Michells F, Messner H, Atenafu E, et al. Patient age, remission status and HCT-CI in combined score are prognostic for patients with AML undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation in CR1 and CR2. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50:1405-10.
171. Miller SA, Dykes DD y Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.
172. Milstein C, Browniee GG, Harrison T, et al. A possible precursor of immunoglobulin light chains. *Nat new boil*. 1972;239:117-20.

173. Mohty M, Malard F, Abecassis M, et al. Revised diagnosis and severity criteria for sinusoidal obstruction syndrome/veno-occlusive disease in adult patients: a new classification from the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51:906-12.
174. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 2001;194:629-44.
175. Nakaya A, Mori T, Tanaka M, et al. Does the hematopoietic cell transplantation specific comorbidity index (HCT-CI) predict transplantation outcomes? A prospective multicenter validation study of the Kanto Study Group for Cell Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20:1553-9.
176. Nash RA, Antin JH, Karanes C, et al. Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood.* 2000;96:2062-8.
177. Nasu R, Nannya Y, Shinohara A, et al. Favorable outcomes of tacrolimus compared with cyclosporine A for GVHD prophylaxis in HSCT for standard-risk hematological diseases. *Ann Hematol.* 2014;93:1215-23.
178. NCBI, [http://phase1browser.1000genomes.org/Homo\\_sapiens/Variation](http://phase1browser.1000genomes.org/Homo_sapiens/Variation)
179. Niederwieser D, Baldomero H, Szer J, et al. Hematopoietic stem cell transplantation activity worldwide in 2012 and SWOT analysis of the worldwide network for blood and marrow transplantation group including the global survey. *Bone Marrow Transplant.* 2016;51:778-85.
180. Niu YY, Ma LM, Zhou Y, Ren R. Relationship between CD4(+)CD25(+) regulatory T cell, IL2, TGF-beta and acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2010;18:735-9.
181. Nivison-Smith J, Dodds AJ, Dunckley H, et al. Increased activity and improved outcome in unrelated donor haematopoietic cell transplant for acute myeloid leukemia in Australia, 1992-2005. *Inter Med J.* 2011;41:27-34.
182. Noori-Daloui M, Rashidi-Nezhad A, Izadi P, et al. Transforming growth factor-β1 codon 10 polymorphism is associated with acute GVHD after allogeneic Bone Marrow Transplant in Iranian population. *Ann Transplant.* 2007;12:5-10.
183. O'Reilly R, Dupont B, Pahwa S, et al. Reconstitution of severe combined immunodeficiency by transplantation of marrow from an unrelated donor. *N Engl J Med.* 1977;297:1311-8.
184. Paczesny S, Hanauer D, Sun Y, et al. New perspectives on the biology of acute GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45:1-11.
185. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant* 2016;786-92.
186. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, et al. Use of haploidentical stem cell transplantation continues to increase: the 2015 European Society for Blood and marrow Transplant activity survey. *Bone Marrow Transplant* 2017;52:811-7.
187. Peled J, Harash A y Jenq R. Role of the intestinal mucosa in acute gastrointestinal GVHD. *Blood.* 2016;128:2395-402.
188. Perlman D y Halvorson HO. A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *J Mol Biol.* 1983;167:391-409.
189. Perrey C, Turner SJ, Pravica V, et al. ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta 1 gene polymorphisms. *Transpl Immunol.* 1999;7:127-8.
190. Petersdorf EW. Which factors influence the development of GVHD in HLA-matched or mismatched transplant. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2017;30:333-5.
191. Petersdorf E, Anasetti C, Martin PJ, et al. Tissue typing in support of unrelated hematopoietic cell transplantation. *Tissue Antigens.* 2003;61:1-11.
192. Pidala J, Lee S, Woo Ahn K, et al. Nonpermissive HLA-DPB1 mismatch increase mortality after myeloablative unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2014;124:2596-606.

193. Pihusch V, Pihusch M, Penovici M, et al. Transforming growth factor beta-1 released from platelets contributes to hypercoagulability in veno-occlusive disease following hematopoietic stem cell transplantation. *Thromb Res.* 2005;116:233-40.
194. Popplewell LL y Forman SJ. Is there an upper age limit for bone marrow transplantation? *Bone Marrow Transplant.* 2002;29:277-84.
195. Qiu L, Yao L, Mao c, et al. TGFB1 L10P polymorphism is associated with breast cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis involving 47817 subjects. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;123:563-7.
196. Raiola A, Dominiotto A, di Grazia C, et al. Unmanipulated haploidentical transplant compared with other alternative donors and matched sibling grafts- *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20:1573-9.
197. Ram R, Gafter-Gvili A, Yeshurun M, et al. Prophylaxis regimes for GVHD: systematic review and meta-analysis. *Bone Marrow Transplant* 2009;43:643-83.
198. Ratanatharhorn V, Nash R, Przeplorka D, et al. Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK 506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 1998;92:2303-14.
199. Remberger M, Torien J, Ringden O, et al. Total nucleated and CD34(+) cell dose on outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*;2015:889-93.
200. Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, et al. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood.* 2006;108:1291-7.
201. Richardson P, Riches M, Kernan N, et al. Phase 3 trial of defibrotide for the treatment of severe veno-occlusive disease and multi-organ failure. *Blood.* 2016;127:1656-65.
202. Ringden O. Introduction to Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005;11:17-20.
203. Robb R, Lineburg K, Kuns R, et al. Identification and expansion of highly suppressive CD8+FoxP3+ regulatory T cells after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 2012;119:5898-908.
204. Robinson S, Mann D, Manas D, et al. The potential contribution of tumour-related factors to the development of FOLFOLX-induced sinusoidal obstruction syndrome. *Br J Cancer.* 2013;109:2396-403.
205. Rocha V, Franco R, Porcher R, et al. Host defense and inflammatory gene polymorphisms are associated with outcome after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood.* 2002;100:3808-918.
206. Russell N, Hunter A, Rogers S, et al. Peripheral blood stem cells as an alternative to marrow for allogeneic transplantation. *Lancet.* 1993;341:1482.
207. Saad A, Mahindra A, Zhang M, et al. Hematopoietic cell transplant comorbidity index is predictive of survival after autologous hematopoietic cell transplantation in multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20:402-8.
208. Satwani P, Ahn K, Carreras J, et al. A prognostic model predicting autologous transplantation outcomes in children, adolescents and young adults Hodgkin lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* 2015;50:1416-23.
209. Savage ND, de Boer T, Walburg KV, et al. Human anti-inflammatory macrophages induce Foxp3+ GITR+ CD25+ regulatory T cells, which suppress via membrane-bound TGFbeta-1. *J Immunol.* 2008;181:2220-6.
210. Sauter C y Giral S. The prognostic impact of peripheral blood progenitor cell dose following high dose therapy and autologous stem cell transplant for hematologic malignancies. *Leuj Lymph.* 2015;56:1619-25.
211. Schetelig J, Bornhauser M, Schmid C, et al. Matched unrelated or matched sibling donors results in comparable survival after allogeneic stem-cell transplantation in elderly patients with acute myeloid leukemia: a report from the Cooperative German Transplant Study Group. *J Clin Oncol.* 2008;26:5183-91.

- 212.Scott BL, Pasquini M, Logan B, et al. Myeloablative versus reduced-intensity hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol.* 2017;35:1154-61.
- 213.SEER, Stat Fact Sheet: Leukemia. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/leuks.html>. 15/08/2017.
- 214.Shah R, Robinson B, Katovich Hurley C, et al. Allelic diversity in the TGFB1 regulatory region: characterization of novel functional single nucleotide polymorphisms. *Hum Genet.* 2006;119:61-74.
- 215.Shaw BE, Gooley TA, Malkki M, et al. The importance of HLA-DPB1 in unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2007;110:4560-6.
- 216.Shaw BE, Mayor N, Szdio R, et al. Recipient/donor HLA and CMV matching in recipient of T-cell depleted unrelated donor haematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2017;52:717-25.
- 217.Shaw BE, Logan B, Spellman S, et al. Development of an unrelated donor selection score predictive on survival after HCT: donor age matter most. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2018;24:1049-56.
- 218.Shimoni A, Kroóger N, Zabelina T, et al. Hematopoietic stem-cell transplantation from unrelated donors in elderly patients (age >55 years) with hematologic malignancies: older age is no longer a contraindication when using reduced intensity conditioning. *Leukemia.* 2005;19:7-12.
- 219.Smeland K, Kiserud C, Lauritzsen G, et al. A national study on conditional survival, excess mortality and second cancer after high dose therapy with autologous stem cell transplantation for non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* 2016;173:432-43.
- 220.Socié G y Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2014;124:374-84.
- 221.Sorensen J, Gerald K, Bodensteiner D and Holmes F. Effect of age on survival in acute leukemia. *Cancer.* 1993;72:1602-6.
- 222.Sorrer M, Logan B, Zhu M, et al. Prospective validation of the predictive power of the Hematopoietic Cell Transplantation Comorbidity Index: a Center for the International Blood and Marrow Transplant Research Study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21:1470-87.
- 223.Sorrer M, Maris MB, Storb R, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood.* 2005;106:2912-9.
- 224.Sorrer M, Sandmaier BM, Storer B, et al. Long-term outcomes among older patients following nonmyeloablative conditioning and allogeneic hematopoietic cell transplantation for advanced hematologic malignancies. *JAMA* 2011;306:1874-83.
- 225.Srinivasan M, Flynn R, Price A, et al. Donor B-cell alloantibody deposition and germinal center formation are required for the development of murine chronic GVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood.* 2012;119:1570-80.
- 226.Stanzani M, Martins SL, Saliba RM, et al. CD25 expression on donor CD4+ or CD8+ T cells is associated with an increased risk for graft-versus-host disease after HLA-identical stem cell transplantation in humans. *Blood.* 2004;103:1140-6.
- 227.Suciu S, Mandelli F, de Witte T, et al. Allogeneic compared to autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1): an intention-to-treat analysis of the EORTC/GIMEMA AML-10 trial. *Blood.* 2003;102:1232-40.
- 228.Sureda A, Bader P, Cesaro S, et al. Indications for allo- and auto-SCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2015. *Bone Marrow Transplant.* 2015;50:1037-56.
- 229.Takasaki H, Tanaka M, Tachibana T, et al. Prognostic factors in patients aged 50 years or older undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancy. *Int J Hematol* 2012;95:291-8.
- 230.Teshima T, Reddy P, Zeiser R. Acute graft-versus-host disease: novel biological insights. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22:11-6
- 231.Thomas D, Ashley C, Lochte H, et al. Homografts of bone marrow in dogs after lethal total-body radiation. *Blood.* 1959;14:720-36.

232. Thomas ED, Buckner D, Clift R, et al. Marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia in first remission. *N Engl J Med.* 1979;301:597-9.
233. Thomas ED, Lochte H y Ferrebee J. Irradiation of the entire body and marrow transplantation: some observations and comments. *Blood.* 1959;14:1-23.
234. Thomas ED, Lochte H, Lu WC, et al. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med.* 1957;257:491-6.
235. Thomas ED, Storb R, Clift R, et al. Bone-Marrow transplantation (first of two parts). *N Engl J Med.* 1975;292:832-43.
236. Thomas ED, Storb R, Clift R, et al. Bone-Marrow transplantation (second of two parts). *N Engl J Med.* 1975;292:895-902.
237. Trinkaus M, Lapinsky S, Crump M, et al. Predictor of mortality in patients undergoing autologous hematopoietic cell transplantation admitted to the intensive care unit. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43:411-5.
238. Troncone E, Marafini I, Stolfi C, et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1/Smad 7 in intestinal immunity, inflammation, and cancer. *Front. Immunol.* 9:1407.doi:10.3389/fimmu.2018.0147.
239. Urso P y Congdon C. The effect of the amount of isologous bone marrow injected on the recovery of hematopoietic organs, survival and body weight after lethal irradiation injury in mice. *Blood.* 1957;12:251-60.
240. Visani G, Malerba L, Stefani PM, et al. BendaEAM (bendamustine, etoposide, cytarabine, melphalan) before autologous stem cell transplantation is safe and effective for resistant/relapse lymphoma patients. *Blood.* 2011;118:3419-25.
241. Vogelsang GB, Lee L y Bensen-Kennedy DM: Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Ann Rev Med.* 2003;54:29-52.
242. Walker S y Dunca D. Estimation of the probability of an event as a function of several independent variables. *Biometrika.* 1967;54:167-79.
243. Wang L, Wu DP, Liu QF, et al. Donor and recipient age, gender and ABO incompatibility regardless of source: validated criteria for donor selection for haematopoietic transplant. *Leukemia.* 2018;32:492-8.
244. Weaver CH, Hazelton B, Birch R, et al. Analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after administration of myeloablative chemotherapy. *Blood.* 1995;39:61-9.
245. Wilcoxon F. Individual comparison by ranking methods. *Biometrics.* 1945;80-3.
246. Wingard JR, Hsu J, Hiemenz JW. Hematopoietic stem cell transplantation: an overview of infections risks and epidemiology. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2011;25:101-16.
247. Wingard R, Majhail N, Brazauskas R, et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2011;29:2230-9.
248. Woolfrey A, Lee S, Gooley T, et al. HLA-allele matched unrelated donors compared to HLA-matched sibling donors. Role of cell source and disease risk category. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16:1382-7.
249. World Marrow Donor Association: <https://statistics.wmda.info/> (21/11/2018).
250. Wu T, Young JS, Jognston H, et al. Thymic damage, impaired negative selection, and development of chronic graft-versus-host disease caused by donor CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol.* 2013;191:488-99.
251. Xi B, Wang Q y Pan H. Transforming growth factor- $\beta$ 1 gene +869T/C but not +915G/C polymorphism is associated with essential hypertension in a Chinese patient cohort. *Mol Biol Rep.* 2012;39:6107-12.
252. Xiao H, Cao W, Lai X, et al. Immunosuppressive cytokine gene polymorphism and outcome after related and unrelated hematopoietic cell transplantation in Chinese population. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17:542-9.
253. Yamada Y, Miyauchi A, Goto J, et al. Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res.* 1998;13:1569-76.



254. Yanada M, Emi N, Naoe T, et al. Tacrolimus instead of cyclosporine used for prophylaxis against graft-versus-host disease improves outcome after hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors, but not from HLA-identical sibling donors: a nationwide survey conducted in Japan. *Bone Marrow Transplant* 2004;34:331-7.
255. Yokota M, Ichihara S, Lin TL, et al. Association of a T29-->C polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Circulation*. 2000;101:2783-7
256. Zaucha R, Gooley T, Holmberg L, et al. High-dose chemotherapy with BEAM or Busulphan/Melphalan and Thiotepa followed by hematopoietic cell transplantation in malignant lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2008;49:1899-906.
257. Zeiser R y Blazar B. Acute graft-versus-host disease- Biologic process, prevention and therapy. *N Engl J Med*. 2017;377:2167-79.
258. Zhang L, Mao L y Xu J. Transforming growth factor-β1 polymorphisms and graft-versus-host disease risk: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2016;7:2455–61.
259. Zhang L, Yan J, Wang Y, et al. Association of TGF-β1 +869C/T promoter polymorphism with susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2013;40:4811-7.
260. Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K, et al. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J Immunol*. 2002;169:4183-9.
261. Zhu J y Paul W. CD4 T cells: fates, functions and faults. *Blood*. 2008;112:1557-69.
262. Ziv E, Cauley J, Morin PA, et al. Association between the T29-->C polymorphism in the transforming growth factor beta1 gene and breast cancer among elderly white women: The Study of Osteoporotic Fractures. *JAMA*. 2001;285:2859-63.
263. Zorn E, Kim HT, Lee SJ, et al. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2005;106:2903