

11290

4

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**PROGRAMA DE MAESTRIAS Y DOCTORADOS EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

Eficacia del factor estimulante de colonias granulocito (FEC-G) en combinación a eritropoyetina beta (EPO) vs el FEC-G para el incremento de células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica de pacientes pediátricos con leucemia, candidatos a trasplante autólogo.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD
AREA: EPIDEMIOLOGIA CLINICA**

PRESENTA:

Dra. María Teresa Dueñas González

TUTOR: M en C Miguel Ángel Villasís Kever

COTUTOR: Dr. Pedro Sobrevilla Calvo

MEXICO, D.F.

Febrero, 2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

Resumen	3
Antecedentes científicos	4
Planteamiento del problema	17
Objetivos	18
Hipótesis	19
Pacientes, materiales y métodos	21
a) Criterios de selección	21
b) Variables	24
c) Análisis estadístico	28
Resultados	31
Discusión	37
Bibliografía	45
Cuadros	52
Figuras	53
Anexos	59

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Título. Eficacia del factor estimulante de colonias granulocito (FEC-G) en combinación a eritropoyetina beta (EPO) vs el FEC-G para el incremento de células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica de pacientes pediátricos con leucemia, candidatos a trasplante autólogo.

Objetivos. 1) Determinar la eficacia del FEC-G con EPO vs la administración exclusiva de FEC-G para incrementar las células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica, 2) Comparar el tiempo para obtener injerto entre los dos grupos de tratamiento.

Pacientes y métodos. Se realizó un ensayo clínico controlado ciego simple, en el Servicio de Hematología Pediátrica del Hospital General del Centro Médico Nacional La Raza de diciembre de 1998 a octubre de 2001. Se incluyeron pacientes menores de 17 años portadores de leucemia mieloblástica en primera remisión y linfoblástica en segunda remisión. Se dividieron en dos grupos de tratamiento: el grupo control que recibió únicamente FEC-G a dosis de 15 µg/kg/día, y el grupo experimental que recibió, además de la misma dosis de FEC-G, EPO a 300 UI/kg/día. Las células progenitoras hematopoyéticas se obtuvieron de sangre periférica utilizando un separador celular Baxter 3000 S. Las variables dependientes fueron la cuantificación de: células CD34⁺ en sangre periférica y de células mononucleares (CMN) y CD34⁺ en la cosecha. Se determinó el número de días para obtener el injerto y el número de ocasiones que se transfundieron concentrados plaquetarios y paquete globular. Se realizó un análisis descriptivo con estadística no paramétrica. La estadística inferencial se realizó con U-Mann-Whitney y la prueba exacta de Fisher.

Resultados. Se estudiaron siete pacientes por grupo. Las características de ambos grupos fueron similares al momento del inicio del estudio. En cuanto a las variables dependientes, la mediana de células CD34⁺ de la cosecha para el grupo experimental fue de 1.2×10^6 /kg mientras que para el grupo control de 2.07×10^6 /kg y para CMN de 4.22×10^8 /kg y 8.2×10^8 /kg respectivamente, sin encontrar diferencia estadística entre los dos grupos, a pesar que en el grupo experimental la cuantificación fue inferior (diferencia relativa mayor del 40%). Al comparar los resultados del tiempo de obtención del injerto, se observó que la mediana para obtener el injerto en el grupo experimental fue de 23 días y para el grupo control de 19 días. Aunque el grupo experimental injertó más tempranamente (cuatro días antes), la diferencia no fue significativa ($p = 0.445$).

Conclusiones. La combinación de las citocinas EPO y FEC-G para la movilización de células de la médula ósea a sangre periférica, produce efectos similares que el uso único de FEC-G. Sin embargo, los resultados sugieren que a pesar de que la cuenta de células CD34⁺ y CMN fue menor en el grupo experimental, por la obtención del injerto en menor número de días, pudiera ser una mejor alternativa. Se propone aumentar el tamaño de la muestra incluyendo solo pacientes con leucemia mieloblástica en primera remisión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANTECEDENTES

Introducción

En los últimos años el pronóstico de niños con leucemia mieloblástica ha mejorado. Con quimioterapia intensiva, entre el 60 y 86% alcanzan remisión completa y del 30 al 50% se curan si reciben quimioterapia intensiva post-inducción (1). Con trasplante de médula ósea alogénico, la sobrevida a largo plazo en pacientes en primera remisión es de 45-64%. Mientras que el 20-30% de pacientes que presentan recaídas pueden ser salvados con este tipo de trasplante, después de obtener una segunda remisión (2).

En pacientes con desórdenes medulares malignos y no malignos, el trasplante de médula ósea logra el restablecimiento de la función de la misma; y puede ser la mejor oportunidad de sobrevida a largo plazo de pacientes con leucemia o neuroblastoma avanzado, en los cuales el tratamiento ha fracasado. (3) Este trasplante consiste en la infusión intravenosa de células progenitoras hematopoyéticas proveniente de donadores; la médula ósea se obtiene mediante múltiples punciones realizadas bajo anestesia general (4,5). El trasplante de médula ósea puede ser alogénico, cuando se utiliza un donador HLA compatible; autólogo, cuando la médula ósea se obtiene del mismo paciente y; singénico, cuando la médula la proporciona un gemelo homocigoto. Sin embargo, sólo una tercera parte de los pacientes que son susceptibles a recibir trasplante de médula ósea, cuentan con donador HLA compatible (5).

Cuando el trasplante de médula ósea no es factible, el trasplante autólogo de células progenitoras de médula ósea, de sangre periférica, ó de células progenitoras de sangre de cordón umbilical, puede ser la alternativa (5,6). El trasplante autólogo ó autotrasplante se ha utilizado para reconstituir la hematopoyesis normal después de quimioterapia antineoplásica intensiva en pacientes con linfomas refractarios (7), leucemia granulocítica crónica (8), y en pacientes con leucemia mieloblástica en remisión completa (9).

El trasplante autólogo

La primera publicación que sugirió la presencia de células progenitoras hematopoyéticas en linfocitos de la sangre fue publicada por Maximow en 1909. Con los adelantos tecnológicos, en los años 60's se demostró que las células progenitoras son residentes permanentes de la sangre periférica como parte de las células sanguíneas mononucleares y, que son capaces de restaurar la hematopoyesis en ratones mieloablatados por irradiación (10).

A partir de 1965, con el desarrollo de los separadores celulares de flujo continuo, se iniciaron los primeros estudios clínicos de colección de células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica. Sin embargo, en vista de su baja concentración, era necesaria la realización de múltiples procedimientos de aféresis para obtener la cantidad suficiente para el injerto, por lo que, para movilizarlas, se utilizaron citocinas y quimioterapia (11).

Actualmente se conoce que el autotrasplante de células progenitoras de sangre periférica es útil en pacientes sin donador HLA idéntico, con la ventaja de que se puede obtener un gran número de células mediante leucaféresis, sin el riesgo

anestésico y el dolor de las múltiples punciones óseas. Se ha observado que existe bajo riesgo de contaminación de las células tallo con células tumorales. Otra ventaja es que las células progenitoras hematopoyéticas periféricas restablecen las funciones hematopoyética e inmune más rápidamente que los progenitores medulares (12). El trasplante autólogo de células progenitoras de sangre periférica, permite el uso de dosis más altas y más efectivas de quimioterapia; además, es posible su realización en pacientes con involucro medular por la enfermedad, necrosis o fibrosis residual por radioterapia (13,14).

La efectividad del trasplante autólogo en pacientes con leucemia depende de cuando menos tres factores: 1) que las células progenitoras colectadas se encuentren en número suficiente para una reconstitución hematológica; 2) la ausencia de las células leucémicas viables en los productos de leucaféresis que son capaces de causar recaída postrasplante y; 3) que el régimen de acondicionamiento pretrasplante sea capaz de eliminar la leucemia residual del paciente (15).

Para realizar el trasplante autólogo de células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica se requieren varias etapas: 1) selección del candidato; 2) movilización de las células progenitoras de médula ósea a sangre periférica, mediante la administración de altas dosis de quimioterapia o citocina, o en combinación; 3) cosecha de células progenitoras hematopoyéticas del paciente; 4) acondicionamiento pretrasplante con altas dosis de quimioterapia; 5) trasplante o infusión intravenosa de las células progenitoras hematopoyéticas cosechadas previamente; y 6) etapa post-trasplante en la que se presenta el injerto (3-5,15).

Factores estimulantes de colonias para la movilización de células progenitoras

Existen dos métodos para la movilización de las células progenitoras hematopoyéticas a sangre periférica, para lograr un injerto. Uno es la administración de quimioterapia a dosis altas, en la cual la magnitud de la movilización y de la cosecha de células se relaciona con la profundidad de la mielosupresión inducida y, con la reserva medular del paciente (16). Uno de los agentes quimioterápicos utilizados es la ciclofosfamida (CFA), a dosis que varían entre 4 y 7 g/m² de superficie corporal (SC) (17,18).

El segundo método para la movilización es mediante el uso de citocinas ya sea solas o en combinación con quimioterapia. Se han realizado estudios administrando factor estimulante de colonias de granulocitos (FEC-G) o con factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (FEC-GM). Las dosis varían entre 5 a 12 µg/Kg cada 12 h, y se han utilizado en diferentes padecimientos como, cáncer de ovario (19,20), enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (12,20,21), mieloma múltiple (22) y cáncer de mama (20); en sujetos con mielofibrosis secundaria también ha sido posible lograr una buena cosecha con el FEC-GM (23).

Con el uso de estas citocinas ha sido posible iniciar la cosecha de células hematopoyéticas después de 48 horas de haber iniciado su administración (21,22,24); en contraste, cuando se utiliza quimioterapia, la cosecha se inicia aproximadamente 11 días después (19,22,25). Brice (25), en 1994 en un estudio retrospectivo, reportó los resultados de 23 pacientes adultos con linfoma y enfermedad de Hodgkin que recibieron dosis altas de quimioterapia más el FEC-G (5 µg/Kg/día). Los resultados de este grupo se compararon con una cohorte histórica

de 37 pacientes donde sólo se utilizó quimioterapia como esquema de movilización. No se encontró diferencia en la cuenta de CMN (número células $\times 10^6/\text{Kg}$ de peso) obtenidas en la cosecha; sin embargo, en los pacientes del primer grupo la mediana para lograr el injerto fue de 10 días, mientras que en el otro grupo fue de 17 ($p < 0.05$).

Demirer y col. (22) compararon tres esquemas de movilización en pacientes con mieloma múltiple: 1) FEC-G a dosis de $16 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ en 19 pacientes; 2) CFA a dosis de $4 \text{ g}/\text{m}^2$ SC más FEC-G $10 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ ó FEC-GM $500 \mu\text{g}/\text{m}^2$ SC/día en siete pacientes y; 3) CFA $4 \text{ g}/\text{m}^2$ SC más etopósido $200 \text{ mg}/\text{m}^2$ SC/día durante tres días más FEC-G $10 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ en 24 pacientes. La variable de resultado fue el número de células $\text{CD}34^+ \times 10^6/\text{Kg}$ en la cosecha. Los pacientes del tercer grupo tuvieron una cuenta significativamente mayor de células $\text{CD}34^+ \times 10^6/\text{kg}$ que los otros dos grupos (5.2, 2.1 y 12.2, respectivamente).

Séller (21) reportó los resultados de dos dosis de FEC-G en pacientes adultos con diagnóstico de linfoma, enfermedad de Hodgkin y cáncer de testículo. Treinta y tres pacientes tratados entre mayo de 1990 y noviembre de 1993 recibieron $10 \mu\text{g}/\text{Kg}$ cada 24 h; mientras que 34 pacientes tratados de diciembre de 1993 a enero de 1995, recibieron $12 \mu\text{g}/\text{Kg}$ cada 12 h. Se encontró que la cuenta total de $\text{CD}34^+ \times 10^7$ en la cosecha fue mayor en el segundo grupo: 11.32 vs. 48.25 ($p = 0.02$). También se observó que los pacientes del primer grupo requirieron entre uno y siete procedimientos de leucaféresis, siendo la mediana de tres; y en el otro grupo, tuvo una mediana de 2, realizándose entre uno y tres procedimientos; sin embargo, no se reportó el valor de significancia estadística.

Weaver (26), en 1998 publicó los resultados de un ensayo clínico controlado donde se compararon los resultados de la administración de cinco diferentes dosis de FEC-G: 10, 20, 30, o 40 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ en 55 pacientes con cáncer de mama. Se observó que las dosis mayores 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ producen mayor cantidad de células CD34^+ en la cosecha. Los autores consideraron que la dosis óptima era de 30 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$, ya que el 64% de los pacientes que recibieron esta dosis, alcanzaron una cosecha de células $\text{CD34}^+ \geq 2.5 \times 10^6/\text{Kg}$; mientras que sólo el 14% llegaron a esta cifra los que recibieron 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ ($p = 0.01$).

Hohaus (27) reportó los resultados de un ensayo clínico controlado donde se compara la utilización de FEC-G con el FEC-GM para la movilización celular. Fueron 26 pacientes adultos con enfermedad de Hodgkin en recaída; la movilización celular se efectuó con dosis altas de quimioterapia a lo que se agregó un día después uno de los dos factores a dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$. En 21 pacientes se realizaron las seis leucaféresis programadas; en nueve (75%) del primer grupo y en doce (85%) del segundo. Tampoco se encontró diferencia estadística en la mediana de unidades formadoras de colonias granulocito-macrófago (UFC-GM): 32.5 vs. 31.3 UFC-GM $\times 10^4/\text{Kg}$; ni en la cuenta de células CD34^+ , 7.6 vs. 5.6 células $\times 10^6/\text{Kg}$.

Cosecha celular para el trasplante autólogo en niños

El trasplante autólogo de médula ósea se empezó a utilizar en los años 50's (28); actualmente las células progenitoras se obtienen más frecuentemente de sangre periférica y se administran posterior a radioterapia o quimioterapia en neoplasias hematológicas y tumores sólidos (28,29). En general, los estudios de movilización en niños han sido para determinar si el procedimiento de leucaféresis se puede llevar a

cabo, independientemente del peso de los pacientes; debido a que ha existido temor por el manejo del volumen extracorpóreo, la anticoagulación y las vías de acceso. Los artículos describen series de casos; la mayoría, con escaso número de pacientes y con diversas enfermedades como linfomas (3,30-32), neuroblastoma (3,30-32), leucemia aguda, mieloblástica y linfoblástica (30-34) y tumores cerebrales (30,32-35).

Takaue en 1989 (31) publicó los resultados de 17 niños portadores de leucemia linfoblástica, mieloblástica o neuroblastoma en los cuales se realizaron entre dos y nueve procedimientos de leucaféresis, después de dos a tres semanas de la administración de quimioterapia mieloablativa. Se obtuvieron de 0.3 a 27.5 CMN x 10⁸/Kg y, de 0 a 2.75 x 10⁴/Kg de UFC-GM. Diez pacientes fueron trasplantados sin especificar el tiempo en que se obtuvo injerto; para acelerar la recuperación celular en dos pacientes, que recibieron 1.2 y 2.8 UFC-GM x 10⁴/Kg se les administró FEC-G después del trasplante. Este mismo autor, en 1989 (34) reportó el caso de un niño con leucemia linfoblástica que se encontraba en la fase post-trasplante sin recuperación de la cuenta de leucocitos en el día +29, el injerto se logró al agregar tratamiento con FEC-G.

También en 1989, Lasky (36) describió el procedimiento de leucaféresis sin movilización (con citocinas o quimioterapia) en dos niños con neuroblastoma; se cosecharon 7.4 y 2.8 x 10⁸/Kg de CMN en más de seis procedimientos de aféresis; se obtuvo injerto en los días 19 y 28 días. En 1991, Lasky (37) publicó los resultados de la cosecha de células progenitoras, también sin movilización, en tres niños menores de 25 Kg de peso, portadores de neuroblastoma; la cuenta de CMN

cosechadas fue de 5.69, 6.39 y $4.78 \times 10^8/\text{Kg}$. El injerto se logró en los días 14, 24 y 48 días; se reportó que hubo una adecuada tolerancia del procedimiento.

En 1992, Takaue (30) describió los resultados de la movilización con altas dosis de arabinósido de citocina en 61 niños con leucemia aguda linfoblástica y mieloblástica, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, retinoblastoma o tumores cerebrales. Se realizaron un promedio de 3.4 procedimientos de aféresis, y se obtuvieron en la cosecha entre 0.7 y 13.6 CMN (promedio 7.1) $\times 10^8/\text{Kg}$, y de 0 a 229 UFC-GM $\times 10^4/\text{Kg}$.

Deméocq (35) en 1994 publicó su experiencia en 20 niños portadores de leucemias, linfomas y tumores sólidos; todos con peso menor a 25 kg. Los procedimientos de leucaféresis se realizaron después de administrar quimioterapia estándar en diez pacientes, dosis altas de quimioterapia en nueve pacientes y radioterapia en un paciente. Trece pacientes recibieron FEC-G 5 ó 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ desde el segundo día de inicio de la quimioterapia hasta la última leucaféresis. Los resultados se observaron en la cosecha, en el grupo que recibió FEC-G se obtuvo de 1 a 399 UFC-GM $\times 10^4/\text{Kg}$, con una mediana de 61.2; en el grupo que no recibió el factor se obtuvieron de 2.8 a 96.2 UFC-GM $\times 10^4/\text{Kg}$, siendo la mediana de 7.9; sin embargo, no se menciona el valor de significancia estadística. Se realizaron entre uno y cuatro procedimientos de aféresis con promedio de 3.3. De veinte pacientes que ingresaron al estudio, doce se trasplantaron con células progenitoras hematopoyéticas obtenidas de médula ósea más las de sangre periférica y ocho pacientes se trasplantaron con células de sangre periférica; los últimos, alcanzaron cifras de neutrófilos absolutos en sangre periférica mayores de $500 \times \text{mm}^3$ entre 11

y 44 días con mediana de 18, sin la administración de citocinas en la etapa post-trasplante para acortar el tiempo de granulocitopenia.

Fukuda en 1992 (3) describe siete niños portadores de neuroblastoma y linfoma no Hodgkin donde se utilizó la quimioterapia habitual para el padecimiento más FEC-G a $400 \mu\text{g}/\text{m}^2$ SC/día para la movilización, este último se inició cuando la cuenta de leucocitos fue menor de $1 \times 10^9/\text{L}$ y terminó en la última cosecha, lo cual ocurrió entre seis y 17 días después, con mediana de 11. Se realizaron de tres a cinco procedimientos de leucaféresis (mediana, 4); la cuenta de CMN $\times 10^8/\text{Kg}$ varió entre 3.8 y 9.8, siendo la mediana de 4.5. La mediana de UFC-GM $\times 10^5/\text{Kg}$ fue de 2.2, fluctuando entre 1.4 y 4.8. La mediana de tiempo para obtener una cuenta de neutrófilos absolutos $> 500/\text{mm}^3$ fue de 10 días, siendo el mínimo de ocho, y el máximo de doce días. Para acortar el tiempo de neutropenia, todos los pacientes recibieron FEC-G en el periodo post-trasplante.

Alegre y col., en 1996 (32) reportaron el uso de FEC-G a dosis de $12 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ en 27 niños con leucemia mieloblástica, leucemia linfoblástica, sarcoma de Ewing, neuroblastoma, meduloblastoma, linfoma, rabdomiosarcoma, astrocitoma o ependinoma. En estos pacientes se les procesó más de tres volúmenes de sangre, en una única sesión de leucaféresis. En 25 pacientes (92.5%) se obtuvo un promedio de $7.5 \times 10^8/\text{kg}$ de CMN, $6.27 \times 10^6/\text{Kg}$ de células $\text{CD}34^+$ y $2.0 \times 10^4/\text{Kg}$ de UFC-GM. En los otros dos, fue necesario realizar otro procedimiento para alcanzar cifras similares.

Eritropoyetina para la movilización de células progenitoras

Para aumentar el número de células progenitoras *in vitro* y la posibilidad de administrarlas posterior a quimioterapia mioablativa, se han realizado estudios de expansión y maduración selectiva con diferentes citocinas, como con interleucina 1, 3, 6, FEC-G, FEC-GM, FEC-M, factor de células tallo (SCF), eritropoyetina (EPO), factor inhibitorio de leucemia e interferón gamma, solas o en múltiples combinaciones (34-35).

Pettengell y col. (40) administraron EPO a dosis de 300 ó 400 U/Kg tres veces por semana durante dos semanas vía subcutánea a 11 pacientes adultos con linfoma no tratados. Para evaluar el efecto del tratamiento tomaron una muestra de sangre periférica y de médula ósea antes y después de su aplicación. Los resultados en sangre periférica fueron: un incremento de 1.6 veces a partir de una cuenta basal de CMN $\times 10^3 \times \text{ml}$ entre 31 a 1428 con mediana de 716 ($p > 0.05$); las UFC-GM $\times 10^5$ aumentaron 7 veces a partir de una cuenta de entre 0 a 177 con mediana de 69, ($p = 0.003$); las células CD34⁺ $\times 10^6 \times \text{L}$ aumentaron 4.6 veces en relación a los valores basales entre 0.1 y 4.1 con mediana de 1.7 ($p < 0.01$). En médula ósea se obtuvieron los siguientes resultados: Un incremento de 2.8 veces a partir de una cuenta de CMN $\times 10^3 \times \text{ml}$ entre 202 a 12 400 con mediana de 743 ($p > 0.05$); En las UFC-GM $\times 10^5$ se encontró un aumento de 2.1 veces en relación a una cuenta basal entre 20 a 374 con mediana de 110 ($p < 0.05$); la cuenta basal de células CD34⁺ $\times 10^6 \times \text{L}$ se encontró entre 2.8 a 343 con mediana de 176 sin aumento significativo en la cuenta realizada posterior a EPO ($p > 0.05$). Estos incrementos no se consideraron suficientes para asegurar injerto; los autores surgieron que con la

combinación de EPO con otras citocinas, al actuar sinérgicamente, se podría obtener un número mayor de células.

Pierelli y col. en 1994 (41) estudiaron *in vitro* el efecto de EPO más FEC-G encontrando que la primera incrementa la acción de la segunda en la diferenciación y desarrollo de progenitores hematopoyéticos hacia el linaje granulocito-macrófago. Posteriormente, administraron esta combinación en cinco pacientes con cáncer de ovario avanzado; las dosis de EPO fueron de 150 U/Kg cada tercer día, y de FEC-G de 5 µg/Kg por día. Ambos se iniciaron en el segundo día de quimioterapia estándar, administrándose hasta por trece días. Los resultados se compararon con otro grupo de pacientes en quienes se había utilizado únicamente FEC-G a la misma dosis. En sangre periférica se obtuvo una cuenta promedio de 16,558 (DE, 5077) células de UFC-GM/mL en el primer grupo; mientras que en el segundo fue de 7,813 (DE, 5886), esta diferencia fue significativa ($p = 0.0361$). Sólo en el primer grupo se cuantificaron las células $CD34^+$ /µl, siendo el resultado de 380 ± 75.8 .

Olivieri en 1995 (42) reportó un estudio retrospectivo de 34 pacientes adultos con enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple y tumores sólidos. En este estudio se comparó la administración de FEC-G a dosis de 5 µgr/Kg/día sólo o en combinación de EPO a dosis de 50 U/Kg/día; ambas citocinas se administraron después de dosis altas de quimioterapia. Se observó que en el grupo con EPO hubo una mayor cosecha de CMN (células $\times 10^9$ /Kg), de UFC-GM (células $\times 10^4$ /Kg) y de $CD34^+$ (células $\times 10^6$ /Kg): 1.9, 4.0 y 2.8 veces, respectivamente; con diferencia estadística.

Kessinger en 1995 (43) estudió la capacidad de movilización de EPO a 200 U X kg X día vía subcutánea en 12 pacientes mayores de 20 años portadores de tumores sólidos con tratamientos previos con quimioterapia por recaídas. Se realizó un procedimiento de leucaféresis basal y, al cuarto día de inicio de la movilización se reiniciaron los procedimientos de leucaféresis hasta alcanzar una cosecha de 6.5×10^6 de células mononucleares; se requirieron entre cinco y 14 procedimientos, siendo la mediana de ocho. Este autor determinó, con respecto a la cosecha basal, un incremento de 25% en células CD34⁺ y de siete veces en las UFC-GM. El injerto se obtuvo entre los días diez y 37 (mediana, 16 días). Estos pacientes recibieron FEC-GM después del trasplante.

En contraste con los estudios anteriores, los cuales apoyan el beneficio de la eritropoyetina en la movilización de células progenitoras a sangre periférica, en 1999 Waller y von Lintig (44-45) publicaron los resultados de un ensayo clínico controlado en 30 pacientes con cáncer de mama. Después de dosis altas de quimioterapia, se formaron dos grupos: el primero recibió FEC-G a 5 µg/Kg/día en combinación con EPO a 150 U/Kg/día, ambos administrados por vía subcutánea SC; el segundo grupo recibió solamente FEC-G a las mismas dosis y vía de administración. Las citocinas se administraron a partir del día siguiente que terminaron la quimioterapia hasta el día que se realizó el último procedimiento de leucaféresis. En ambos grupos la cuenta en sangre periférica de CMN se incrementó en el día +12. Las células CD34⁺ comenzaron a elevarse en el día +8 con un pico en el día +10. Estos autores determinaron, en el primer producto de leucaféresis, entre 3.1 y 19 CMN x 10⁷/Kg, con mediana de 11.2 para el grupo experimental; en el grupo control la

cuenta varió entre 6.1 y 30.7, con mediana de 11.8. La mediana de cuenta de células CD34⁺ fue de 4.79 células x 10⁶/Kg, con valores extremos de 0.82 y 14.71 en el primer grupo; mientras que la mediana para el segundo fue de 6.24, y la variación entre 1.15 y 18.74. Mientras que la mediana de UFC-GM x10⁶/Kg fue de 94 (mínimo, 30; máximo, 808), y de 84 (mínimo, 0; máximo, 293) respectivamente. En ninguna de estas comparaciones se observaron diferencias significativas. Lo mismo sucedió para la cuenta de células CD34⁺ x 10⁶/Kg transfundidas durante el trasplante: 2.8 vs. 5.8; y para la mediana en días para lograr el injerto (10 días en ambos grupos).

En pacientes con mieloma múltiple, Krejci en el año 2000 (46), reportó la comparación de tres esquemas de movilización celular, administrados por vía subcutánea: 1) CFA 5 g/m² SC más FEC-G a 5 µg/Kg/día; 2) CFA 5 g/m² SC más FEC-G a 10 µg/Kg/día SC y; 3) CFA 5 g/m² SC más FEC-G a 5 µg/Kg/día y más EPO 50 U/Kg. Los autores concluyen que el esquema que produce la mejor movilización es el primero y, que aumentar la dosis de FEC-G a 10 µg/Kg/ día o agregar EPO no mejora los resultados en forma significativa.

Recientemente, Miller (47) después de analizar la información y encontrar solamente un ensayo clínico controlado sobre la eritropoyetina, concluye que el papel en el trasplante de células progenitoras en la movilización de células progenitoras hematopoyéticas de esta citocina no está definido.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El autotrasplante de células progenitoras hematopoyéticas obtenidas de sangre periférica ha demostrado ser de utilidad en pacientes portadores de leucemia. Uno de los factores involucrados en el éxito del trasplante es el número de células a transplantar; se han utilizado diversos esquemas para movilizarlas de médula ósea a la sangre periférica, algunos incluyen al FEC-G con lo cual se ha observado una respuesta adecuada. El FEC-G en combinación con eritropoyetina parece tener un efecto sinérgico, pero por la falta de ensayos clínicos controlados, especialmente en niños, no se conoce si esta combinación es mejor para el incremento del número de células progenitoras y para acortar el tiempo para obtener el injerto en pacientes sometidos a trasplante autólogo. De esta manera nos preguntamos:

1. ¿ Es mayor el incremento de células progenitoras hematopoyéticas en sangre periférica en pacientes pediátricos con leucemia, candidatos a trasplante autólogo con FEC-G en combinación con eritropoyetina beta que con la sola administración de FEC-G?
2. ¿ Se podrá disminuir el tiempo para la obtención del injerto en pacientes pediátricos sometidos a trasplante autólogo con la movilización de células progenitoras a sangre periférica con FEC-G en combinación de eritropoyetina beta que con la sola administración de FEC-G?

OBJETIVOS GENERALES

1. Determinar la eficacia del FEC-G en combinación con EPO vs la administración exclusiva FEC-G para el incremento de células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica en pacientes pediátricos con leucemia, candidatos a trasplante autólogo.
2. Comparar el tiempo para obtener injerto en pacientes pediátricos con leucemia sometidos a trasplante autólogo después de la movilización de células progenitoras hematopoyéticas con FEC-G en combinación con EPO o con FEC-G exclusivamente.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1a. Comparar la cuenta de células CD34 en sangre periférica durante los días de aplicación de los factores de estimulación de colonias.
- 1b. Comparar la cuenta de CMN y células CD34 obtenidas en la cosecha de cada día posterior a la aplicación de los factores estimulantes de colonias.
- 2a. Comparar la cuenta de plaquetas y granulocitos en sangre periférica posterior al trasplante autólogo, hasta obtener el injerto.
- 2b. Comparar el número de transfusiones de paquete globular y concentrados plaquetarios que requiera el paciente posterior al trasplante, hasta obtener el injerto.

HIPOTESIS GENERAL

1. El FEC-G en combinación con EPO produce un incremento mayor del 50% en el número de células progenitoras hematopoyéticas en sangre periférica que la sola administración de FEC-G en pacientes pediátricos con leucemia, candidatos a trasplante autólogo.
2. La movilización de células progenitoras hematopoyéticas a sangre periférica con FEC-G en combinación con EPO produce una disminución del 20% en el número de días para obtener injerto que el que produce el FEC-G en pacientes pediátricos con leucemia candidatos a trasplante autólogo.

HIPOTESIS ESPECIFICAS

- 1a. El FEC-G en combinación con EPO produce un incremento mayor del 50% en la cuenta de células CD34⁺ en sangre periférica que la sola administración del FEC-G en pacientes pediátricos con leucemia candidatos a trasplante autólogo, durante la aplicación de los factores.
- 1b. El FEC-G en combinación con EPO produce un incremento mayor del 50% en el número de células CD34⁺ y CMN en el producto de la colección a partir del primer día de cosecha que la sola administración del FEC-G en pacientes pediátricos con leucemia candidatos a trasplante autólogo.
- 2a. La movilización de células progenitoras hematopoyéticas a sangre periférica con FEC-G en combinación con EPO produce una cuenta de plaquetas mayor de 50,000/mL y una cuenta de granulocitos mayor de 500 cel/mL en tres determinaciones seguidas (sin transfusión de concentrados plaquetarios) en menos

días posterior al trasplante que la sola administración de FEC-G en pacientes pediátricos con leucemia candidatos a trasplante autólogo.

2b. La movilización de células progenitoras hematopoyéticas a sangre periférica con FEC-G en combinación con EPO produce un menor requerimiento transfusional después del trasplante que la sola administración de FEC-G en pacientes pediátricos con leucemia sometidos a trasplante autólogo.

PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

En el Servicio de Hematología Pediátrica del Hospital General del Centro Médico Nacional La Raza a partir de diciembre de 1998 y hasta octubre de 2001 se realizó un ensayo clínico controlado, ciego simple. Previo al inicio del estudio, el protocolo fue aprobado por el Comité local de Investigación y Bioética. Todos los pacientes iniciaron el procedimiento después que los padres firmaron una carta de consentimiento informado.

Pacientes. Tomando en cuenta los procedimientos para lograr el trasplante, los criterios de selección de los pacientes se dividieron en dos fases. Para la primera fase se incluyeron pacientes menores de 17 años de edad, portadores de leucemia mieloblástica en primera remisión, promielocítica en segunda remisión y leucemia linfoblástica en segunda remisión. No se incluyeron pacientes con alteraciones psiquiátricas, metabólicas, cardíacas, hepáticas o renales. Mientras que los criterios de exclusión considerados fueron: cuando el paciente o los padres rehusaran a continuar en el estudio; la presencia de reacciones secundarias al factor estimulante de colonias o a EPO o de alteraciones hemodinámicas o metabólicas durante el procedimiento de aféresis.

En la segunda fase (evaluación del injerto), se incluyeron los pacientes seleccionados en la primera fase del protocolo que continuaran en buenas condiciones para recibir altas dosis de quimioterapia y que en la cosecha de células obtenida mediante los dos procedimientos de aféresis se encontraran un mínimo de 3×10^8 /Kg de CMN.

No se incluyeron los pacientes que presentaron fiebre (temperatura axilar mayor de 38°C en más de una ocasión en 24 horas, o bien, una sola determinación $\geq 39^\circ\text{C}$) no relacionada con la aplicación del FEC-G; o los pacientes en quienes se sospechaba de algún proceso infeccioso. Se excluyeron aquellos casos donde los padres o el paciente se negaron a continuar en el estudio; o cuando ocurrió el fallecimiento antes de la evaluación de injerto.

Intervención. En el anexo 1 se describen las fases para la realización del trasplante. Se consideró el día 0 la fecha de realización del trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. La fase pre-trasplante incluye la etapa de movilización, cosecha celular y acondicionamiento; en la fase post-trasplante es el periodo en el que se espera se presente el injerto.

La maniobra experimental se realizó durante la fase de movilización celular; en esta fase los pacientes se dividieron en dos grupos de tratamiento: el grupo control que recibió únicamente FEC-G, y el grupo experimental que recibió FEC-G más EPO.

1. Pre-trasplante

1.1 Movilización celular

En ambos grupos de pacientes la maniobra inició con la administración de FEC-G a dosis de 15 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. La dosis se dividió en dos, para su aplicación cada 12 horas por vía subcutánea. El FEC-G se administró hasta alcanzar una cuenta de leucocitos $>10,000/\text{mL}$ en sangre periférica, esta cifra generalmente se alcanzó a los cuatro días de haber iniciado la administración (anexo 1). En el grupo experimental se administró además EPO por vía subcutánea una vez al día, la dosis fue de 300

UI/Kg. La administración de citocinas en ambos grupos fue hasta el día -5 del trasplante.

1.2 Cosecha celular

Las células progenitoras hematopoyéticas se obtuvieron de sangre periférica los días -6 y -5. Para este procedimiento se utilizó un separador celular Baxter 3000 S. (31-32,36) Las células recolectadas se guardaron en refrigeración a 4° C durante seis días en el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional la Raza.

1.3 Acondicionamiento

Todos los pacientes recibieron doce dosis de busulfan vía oral; la dosis fue de 1 mg/Kg/dosis administrado cada 6 horas durante tres días. Este medicamento se inició inmediatamente después del término de la aféresis desde el día -5 hasta el día -2. En los días -3 y -2 se agregó ciclofosfamida, la dosis fue de 60 mg/kg/día y se aplicó vía intravenosa. Se administró también uromitexan (mesna), calculándose a 120% de la dosis de ciclofosfamida; esta dosis se dividió en cuatro para administrarla por vía IV a las 0, 3, 6 y 9 horas, tomando como hora cero el inicio de la ciclofosfamida (anexo 1).

Durante la quimioterapia se mantuvo al paciente con líquidos a 2500/m² más bicarbonato 30 mEq/L; se administró además ondansetrón cada 8 h, a dosis de 4 mg/m² SC/ dosis. Además de ciprofloxacina a 20 mg/Kg/día en dos dosis cada 12h; nistatina 15 mL tres veces al día por vía oral y; aciclovir 750 mg/m² SC/día por vía IV.

3. Trasplante

Después de un día de descanso sin quimioterapia, la cosecha celular obtenida en el

día -6 se administró por vía IV. en el día 0; y la obtenida en el día -5, en el día 1 (anexo 1).

Aleatorización. Previo al inicio del estudio se planeó la asignación de la intervención en dos grupos, para este proceso se utilizó una tabla de números aleatorios. Una vez identificados los dos grupos, se realizó la lista correspondiente. La tesista guardó la lista con la secuencia de los tratamientos; cada vez que existía un nuevo paciente, ella era la única encargada de informar el tipo de tratamiento asignado. La decisión de brindar uno u otro tratamiento, siempre se basó en la lista realizada al principio (figura 1).

Cegamiento. El estudio se considera ciego simple. El personal involucrado para la evaluación de las variables de resultado fue independiente al grupo de trabajo y desconocía el tipo de tratamiento asignado. Las variables CD34⁺, cuenta de leucocitos, hemoglobina y cuenta de plaquetas fue realizado por el personal de laboratorio. Las variables relacionadas con el aspecto clínico: efectos colaterales, número de transfusiones de paquete globular y concentrados plaquetarios fueron recolectados por los médicos tratantes y el personal de enfermería. Aunque todos los pacientes desconocían la intervención entre uno y otro grupo, no se dio una maniobra 'extra', como efecto placebo, al grupo que no recibió EPO.

Variables de resultado. La información sobre el efecto del tratamiento se dividió con base en las fases del trasplante.

1. Pre-trasplante

1.1 Movilización celular

Cuantificación de leucocitos y células CD34⁺ en sangre periférica. A cada paciente se le extrajeron diariamente 4 ml de sangre que se colocaron en dos tubos con anticoagulante desde que se inicia la administración de citocinas hasta el día -5. La medición fue realizada por personal independiente al estudio, quienes desconocían el grupo de tratamiento al que pertenecía cada muestra. Los leucocitos se cuantificaron mediante un coulter automatizado. La cuenta total de leucocitos se registró por mm³.

La cantidad de células CD34⁺ se cuantificó mediante citometría de flujo, posterior a ser marcadas con un anticuerpo monoclonal específico (48). El resultado de células CD34⁺ registrado fue número de células x 10³/mm³.

1.2 Cosecha celular

Durante los dos días en que se llevó a cabo el procedimiento de aféresis, se realizó la medición del número de células CD34⁺ y CMN, así como la determinación de la viabilidad celular, los cuales se llevaron a cabo en cada bolsa de células cosechadas. Un tubo con un mililitro de la cosecha se envió al laboratorio etiquetado sin contener información del grupo de tratamiento al que correspondía. La cantidad de CMN se cuantificó de acuerdo a la técnica habitual mediante coulter automatizado con cuenta posterior del porcentaje de linfocitos y monocitos mediante microscopio de luz por el químico del laboratorio de Hematología Especial. La cantidad de células en cada mililitro se divide entre el peso del paciente. De esta forma las CMN se reportaron en número de células x 10⁹/Kg peso corporal.

Las células CD34⁺ se cuantificaron en una muestra de un mililitro de la cosecha obtenida por aféresis de la misma forma que se hizo en sangre periférica (48). De

acuerdo con el volumen de la cosecha y el peso de paciente, se obtuvo el registro de la cuenta total de células $CD34^+ \times 10^6/Kg$.

La determinación de la viabilidad celular la realizó el químico del laboratorio de hematología especial. Se realizó una mezcla de 0.5 ml de solución buffer fosfatada, 0.5 ml de azul de tripano y de 0.5 ml de la cosecha; después de mantener en reposo por cinco minutos, se colocó una gota sobre una laminilla y se cubrió con un cubreobjetos. Mediante microscopio de luz en inmersión se cuantifica el número de células vivas, las cuales se identifican al no poseer colorante en su interior. El número de células vivas se divide por el total de células, reportándose en porcentaje (49).

2. Post-trasplante

Diariamente, desde el trasplante hasta el egreso hospitalario se determinó en sangre periférica el número de neutrófilos absolutos y de plaquetas. Esta cuenta se realizó en dos mililitros de sangre periférica tomada del paciente y se procesó en el laboratorio de hematología especial por el químico encargado, mediante coulter automatizado; para obtener el porcentaje de neutrófilos se utilizó microscopía de luz. La cuenta de plaquetas se obtuvo directamente del coulter. Se consideró injerto cuando en dos determinaciones diarias seguidas se encontró una cuenta de neutrófilos absolutos $\geq 500/mm^3$. Además, se registró el día en que el paciente alcanzó cifras de plaquetas mayores de $50,000/mm^3$ sin necesidad de transfusión. Por último, cada ocasión que los pacientes requirieron transfusión de concentrados plaquetarios o de paquetes globulares, fue registrada por el médico encargado del área de trasplante en la hoja de recolección de información.

Vigilancia. Al igual que los apartados anteriores, se divide de acuerdo con el proceso del trasplante:

1. Pre-trasplante

1.1 Movilización celular

El tratamiento para la movilización celular fue administrado por personal de enfermería asignado a la unidad de trasplante. En conjunto con el personal médico vigilaban la presencia de fiebre, dolor óseo o articular, y reacciones de hipersensibilidad. El FEC-G se suspendió cuando la cuenta de leucocitos en sangre del paciente fue $>70,000/\text{mm}^3$, o cuando se presentó reacción anafiláctica. En el grupo que recibió EPO se vigiló en forma más estrecha las cifras de tensión arterial, se suspendió su administración en caso de tener cifras consideradas como hipertensión arterial (50).

1.2 Cosecha celular

La cosecha celular se llevó a cabo cuando había $\geq 10,000$ leucocitos/ mm^3 . Esto pudo ocurrir desde el cuarto día de administración de las citocinas. La cosecha celular se realizó en la unidad de aféresis del Servicio de Hematopediatría del Centro Médico Nacional La Raza. Durante el procedimiento de leucaféresis se vigiló la presencia de alteraciones hemodinámicas y toxicidad por anticoagulante; en caso de presentarse se redujo el flujo de sangre hacia la máquina o se suspendió el procedimiento hasta la estabilización. En caso de presentar fiebre no relacionada a la aplicación del FEC-G o cuando hubo sospecha clínica de proceso infeccioso se suspendió el acondicionamiento.

Acondicionamiento

Al obtener una cosecha celular mediante los dos procedimientos de leucaféresis más de $3.0 \times 10^8/\text{Kg}$ CMN, se inició la administración de la quimioterapia de acondicionamiento pre-trasplante con busulfan y ciclofosfamida. Se vigiló la administración de líquidos, medicamentos, diuresis, presencia de fiebre, náusea y mucositis. Se inició tratamiento antimicrobiano en caso de fiebre con el esquema habitual del paciente con neutropenia y fiebre (51).

2. Post-trasplante

Todos los pacientes permanecieron en cuarto de aislamiento convencional con aire no filtrado hasta que alcanzaron cifras de neutrófilos absolutos mayores a $500 \times \text{mm}^3$. En los pacientes que presentaron temperatura axilar mayor de 38°C en dos ocasiones durante 24 h o una sola determinación de 39°C se inició el esquema de tratamiento habitual del paciente con neutropenia y fiebre (51). En caso de presentar manifestaciones clínicas de sangrado o una cuenta de plaquetas $< 20,000$ se transfundía con plaquetas obtenidas de donador único por aféresis. En caso de presentar cifras $< 8 \text{ g} \times \text{dL}$ se transfundía con paquete globular desleucocitado.

Análisis estadístico

1. Tamaño de muestra

Antes del inicio del estudio no había estudios donde se compararan ambos tratamientos. Debido a esta falta de información, el cálculo del tamaño de la muestra se basó en los resultados de estudios anteriores con UFC-GM (37). La EPO y el FEC-G tienen efecto en la movilización de células progenitoras hematopoyéticas de

médula ósea a sangre periférica, lo cual se observa en el número de células CD34⁺ o UFC-GM. Con UFC-GM son necesarios hasta 14 días para evaluar la movilización, mientras que con células CD34⁺, sólo algunas horas.

El cálculo del tamaño de muestra se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$N \text{ por grupo} = 2 (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \times \sigma^2 / \Delta^2 ; \text{ donde,}$$

Z_{α} para alfa de 0.05 = 1.645

Z_{β} para beta de 0.20 = 0.84

$\Delta = \mu_1 - \mu_2 = 16,558 - 7,813 = 8,745$

μ_1 = promedio en el grupo experimental

μ_2 = promedio en el grupo control

σ = desviación estándar = 5,077

Al despejar:

$$N \text{ por grupo} = 2 (1.645 + 0.84)^2 \times 5.077^2 / 8.745^2 \\ = 7.3 \text{ pacientes por grupo.}$$

2. Captura de la información

La información obtenida se recolectó en formatos diseñados expreso (anexos 2,3,4).

Se diseñó una base de datos en Excel donde se capturó la información.

3. Análisis descriptivo

Para las variables cuantitativas se determinó su distribución mediante sesgo y curtosis, éste análisis demostró que no había distribución normal. De ésta forma se utilizó mediana como medida de tendencia central; la medida de dispersión utilizada

fue intervalo de confianza para medianas al 95%. Las variables cualitativas se presentaron como número absoluto y/o porcentaje.

Los intervalos de confianza para medianas se calcularon mediante las siguientes fórmulas:

$$r = n/2 - (1.96 \times \sqrt{n} / 2)$$

$$s = 1 + n/2 + (1.96 \times \sqrt{n} / 2)$$

4. Análisis inferencial

se realizó mediante estadística no paramétrica debido a que de acuerdo al sesgo y curtosis de los datos la distribución no es normal mediante comparación de promedios para dos grupos independientes a través de U-Mann-Whitney y para variables cualitativas la prueba exacta de Fisher; un valor de $p < 0.05$ de una cola se consideró estadísticamente significativo. Se realizó curva de supervivencia a partir del trasplante por el método Kaplan y Meier y comparación entre grupos con la prueba de Log Rank. Se utilizó paquete estadístico SPSS versión 7.0.

5. Potencia

Se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$Z_{\beta} = \Delta(n) / \sigma^2 - Z_{\alpha}$$

Donde, Z_{β} = poder; Z_{α} = para alfa de 0.05 = 1.645; d = magnitud de la diferencia detectada; n = número de individuos expuestos estudiados y σ = desviación estándar en la población.

RESULTADOS

Características generales de los pacientes

Durante el período de estudio se incluyeron catorce pacientes con leucemia aguda; diez tenían leucemia mieloblástica y se encontraban en primera remisión; y los cuatro con leucemia linfoblástica estaban en segunda remisión por recaída a médula ósea (1), al sistema nervioso central (2) ó a médula ósea y testículo (1). Una de la pacientes estaba considerada como leucemia mieloblástica secundaria, ya que a la edad de tres meses recibió tratamiento para retinoblastoma, en el momento de la inclusión al estudio tenía seis años.

Variables de resultado

La información sobre resultados del efecto del tratamiento se dividió con base en las fases del trasplante:

1. Período pre-trasplante (figura 1)

Siete pacientes fueron asignados al grupo FEC-G (grupo control) y siete al grupo FEC-EPO (grupo experimental). En el cuadro 1 se presentan las características de los dos grupos, se observa que no hubo diferencia estadística en la edad, número de tratamientos previos, tiempo del diagnóstico al momento del trasplante, tiempo del último tratamiento de quimioterapia e inicio de movilización celular. Sin embargo, en el grupo control el tiempo a partir del diagnóstico al momento del trasplante fue más corto que en el grupo experimental. Esto mismo se observó en el número de cursos de quimioterapia previos al trasplante.

1.1 Movilización celular

No hubo diferencia entre los grupos en la determinación del número de leucocitos en sangre periférica. En el día -6 en el grupo experimental tuvo una mediana de 36.4 células x 10³/L (IC95% 14 - 55) mientras que la mediana para el grupo control fue de 29.6 x 10³/L (IC95% 17 - 57). En el día -5 el grupo experimental tuvo una mediana de 29.2 células x 10³/L (IC95% 7 - 64) mientras que la mediana para el grupo control fue de 30.5 x 10³/L (IC95% 16 - 65).

La determinación de células CD34⁺ en sangre periférica se llevó a cabo en 10/14 pacientes. En tres pacientes del grupo FEC y en uno del FEC-EPO las muestras sanguíneas no se conservaron en condiciones adecuadas. También se observó que la cantidad de células CD34⁺ en sangre periférica obtenida en los días de cosecha fue similar entre ambos grupos (figuras 2 y 3); en el día -6, en el grupo experimental se determinó una mediana de 22 células x 10³/mL (IC95% 0 - 130), mientras que la mediana para el grupo control fue de 24.29 células x 10³/mL (IC95% 1.4 - 68). Para el día -5, en el grupo experimental se determinó una mediana de 17.5 células x 10³/mL (IC95% 0.5 - 80) mientras que la mediana para el grupo control fue de 6.6 células x 10³/mL (IC95% 0.34 - 89). Desde el punto estadístico, la comparación de medianas para el día -6 fue de p = 0.91; y para el día -5, p = 0.76.

1.2 Cosecha celular

En el grupo experimental, la mediana para el inicio de cosecha de células progenitoras hematopoyéticas fue de cuatro días (IC95% 4 - 4) después de que comenzó la movilización; mientras que en el grupo control la mediana de inicio fue a

los cinco días (IC95% 4 – 12). La comparación de estos valores no mostró significancia estadística ($p = 0.905$).

Cuando se comparó la determinación del número de CMN entre ambos grupos, tampoco se encontraron diferencias (figura 4). La mediana para el grupo experimental fue de $4.22 \times 10^8/\text{Kg}$ (IC95% 3.2 – 11) y para el grupo control de $8.2 \times 10^8/\text{Kg}$ (IC95% 5.42 - 8.88); el valor estadístico obtenido de esta diferencia fue $p = 0.128$.

Con relación a la determinación del número de células CD34^+ , la mediana del grupo experimental fue de $1.2 \times 10^6/\text{Kg}$ (IC95% 0.40 – 4.9) mientras que la mediana para el grupo control fue de 2.07 células $\text{CD34}^+ 10^6/\text{Kg}$ (IC95% 0.20 - 8.6), siendo el valor $p = 0.71$ (figura 5).

La comparación de las medianas de viabilidad de las células durante la cosecha fue similar entre ambos grupos ($p = 0.53$). En el grupo experimental fue del 97.5% (IC95% 95 – 99) mientras que en el grupo control del 95% (IC95% 95 – 98). En el momento del trasplante tampoco hubo diferencias en la viabilidad; después de seis días de refrigeración, la viabilidad fue del 85.25% (IC95% 79 – 93) y de 80% (IC95% 75 – 89), respectivamente ($p = 0.486$).

2. Trasplante

Todos los pacientes que entraron a la etapa movilización se trasplantaron. La paciente con leucemia mieloblástica secundaria, falleció en el día +5 post-trasplante y no se consideró en el análisis de las siguientes etapas. El motivo del fallecimiento fue enfermedad hepática veno-oclusiva y sepsis. Esta paciente correspondía al grupo FEC-G + EPO.

3. Post-trasplante

Todos los pacientes injertaron entre el día 14 y 48, siendo la mediana de 19 días. Al comparar el tiempo para obtener el injerto entre los dos grupos se determinó que la mediana para obtener el injerto en el grupo experimental fue de 19 días (IC95% 14 – 48) mientras que para el grupo control de 23 (IC95% 17 – 27); esta diferencia no tuvo significancia estadística, $p = 0.445$.

No se encontró diferencia estadística en el tiempo para alcanzar una cuenta de plaquetas mayor a $50 \times 10^3/L$ sin transfusión. La mediana para ambos grupos fue de 26.5 días, en tanto que los IC95% fueron de 14 – 63 días para el grupo experimental y de 18 – 52 para el grupo control ($p = 0.73$).

Los requerimientos transfusionales fueron similares en ambos grupos. La mediana del número de ocasiones que se transfundieron concentrados plaquetarios en el grupo experimental fue de 4.5 ocasiones (IC95% 2 – 8) mientras que fue de cuatro (IC95% 1 – 19) en el grupo control ($p = 0.836$). En cuanto a la transfusión de paquete globular, en el grupo experimental, 2.5 ocasiones (IC95% 1 – 5) requirieron transfusión; en el grupo control, la mediana fue de 2 (IC95% 1 – 2), $p = 0.18$.

Complicaciones

Al igual que los apartados anteriores, se divide de acuerdo con el proceso del trasplante:

1. Pre-trasplante

1.3 Movilización celular

En todos los pacientes incluidos hubo una adecuada tolerancia de las citocinas. En un

paciente del grupo experimental la administración de el FEC-G se suspendió durante el día -7 cuando la cuenta de leucocitos en sangre fue $>70,000/\text{mm}^3$. Ninguno de los pacientes que recibieron EPO presentó hipertensión arterial.

1.2 Cosecha celular

En general, la cosecha celular se llevó a cabo sin complicaciones. Una paciente del grupo control presentó problemas de flujo de sangre hacia el separador celular, por lo que después de procesar un volumen sanguíneo se suspendió el primer procedimiento de leucaféresis. El segundo procedimiento de leucaféresis se realizó una vez que se colocó un nuevo catéter tipo Mahurkar, y se procesaron los tres volúmenes sanguíneos programados, sin mayor dificultad.

1.3 Acondicionamiento

Durante esta fase, todos los pacientes presentaron náusea en grado variable, la cual se controló con antieméticos sin problemas en todos los casos.

2. Trasplante

La cosecha de células se administró vía intravenosa sin problemas en los pacientes de ambos grupos.

3. Post-trasplante

Durante el periodo de neutropenia, 2/7 (28.5%) pacientes del grupo control presentaron fiebre, uno de ellos tenía herpes labial como único proceso infeccioso aparente y en el segundo no se identificó foco infeccioso. En el grupo experimental 5/7 (71.4%) pacientes presentaron fiebre, documentándose infección solamente en

dos: uno presentó absceso perianal, y el otro herpes labial y bacteriemia por *Serratia licuefaciens*.

La mediana de hospitalización, a partir del inicio de la movilización en ambos grupos fue de 33 días, en tanto que los IC al 95% fueron de 30 – 40 para el grupo experimental y de 23 – 47 para el grupo control ($p = 1.0$).

Evolución al egreso hospitalario

Hasta noviembre del 2001, todos los pacientes del grupo FEC-G se encontraban vivos; de los cuales 6/7 (86 %) pacientes estaban en remisión completa. Un paciente con leucemia mieloblástica presentó recaída medular 335 días después del trasplante. El periodo total de vigilancia, a partir del trasplante en este grupo tuvo una mediana de 372 días (IC95% 28 – 1072). En el grupo FEC-G + EPO, 4/6 (67%) pacientes se encontraban vivos y en remisión completa. Tres pacientes con leucemia linfoblástica presentaron recaída, dos a médula ósea y uno al sistema nervioso central; el tiempo de recaída después del trasplante fue de 122, 393 y 102 días respectivamente. Los dos pacientes con recaída medular fallecieron un tiempo después de la tercera recaída. En este grupo, el periodo de vigilancia a partir del trasplante en el grupo experimental hasta la última consulta tuvo una mediana de 365 días (IC95% 105 – 575). A pesar que en la figura 6 se observa que el grupo control pareciera tener una mejor sobrevida actuarial, no se encontró diferencia estadística en la comparación del tiempo de vigilancia entre los grupos ($p = 0.15$).

DISCUSIÓN

El uso de células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica en la actualidad es un procedimiento común debido a la disponibilidad de separadores celulares y la posibilidad de movilizar las células de médula ósea a la sangre periférica; su administración permite injerto posterior a dosis altas de quimioterapia mieloablativa en diversas situaciones clínicas (29-32,33)

De las razones que motivaron la realización del presente estudio fue que en diferentes estudios *in vitro* se ha demostrado que el número de células progenitoras hematopoyéticas se incrementa mediante expansión y maduración selectiva, utilizando diferentes citocinas, entre ellas EPO (38-39), y que existe controversia de los resultados en los estudios clínicos con EPO. Por ejemplo, Pettengell (40) y Kessinger (43), reportan que el uso de EPO sola tiene efecto de estimulación y movilización sobre las células progenitoras hematopoyéticas. Pierelli (41) y Olivieri (42) en dos estudios no aleatorizados reportan ventaja al agregar EPO al FEC-G para la movilización de células progenitoras hematopoyéticas. En contraste a los estudios anteriores Waller y von Lintig (44,45) y Krejci (46) mediante estudios aleatorizados, no encuentran ventaja al adicionar EPO al FEC-G.

Debido a esta controversia, y en virtud de la falta de buenos diseños en los estudios anteriores, se decidió la realización de un ensayo clínico controlado, para determinar la utilidad de EPO para el trasplante autólogo en niños con leucemia.

Hallazgos

Los resultados de este estudio no apoyan que la EPO ofrezca algún beneficio en el trasplante autólogo en niños con leucemia. Todas las variables de resultado,

incluyendo células CD34⁺ y CMN, tanto en sangre periférica como en la cosecha mostraron resultados similares. Sin embargo, en el grupo experimental el número de CMN fue menor que el grupo control, aunque sin significancia estadística. Esto mismo sucedió en la cuantificación de células CD34⁺ en la cosecha. Para ambas variables, al comparar el valor de la mediana, hace una diferencia relativa de más del 40% en favor del grupo control. Es posible, que la variabilidad de los resultados, en conjunto con el número de pacientes incluidos, haya influido para que desde el punto de vista estadístico no se hubiera detectado diferencia para apoyar que el grupo que recibió EPO presentó una respuesta inferior al grupo control. Este mismo efecto ya había sido observado en el estudio de Waller y col (45), estos autores determinaron una diferencia del 20% favoreciendo también al grupo en que no se utilizó EPO, pero tampoco obtuvieron significancia estadística.

Desde otro punto de vista, el hecho que los estudios anteriores no cumplieron los elementos de un ensayo clínico controlado suponen resultados que no son confiables. Es ampliamente conocido el efecto que tienen los ensayos clínicos abiertos, en estos estudios habitualmente se encuentran diferencias, sin que realmente existan. Esta es una de las razones donde se apoya el concepto que los ensayos clínicos controlados son el estándar para determinar la eficacia y efectividad de alguna intervención (52).

Confiabilidad de los hallazgos

El hecho de no haber rechazado la hipótesis de trabajo hacen necesario la discusión sobre la veracidad de los resultados:

Diseño del estudio

El presente ensayo clínico reunió todas las características que identifican la calidad de este tipo de estudios. En general, son tres elementos que se utilizan para la evaluación de los ensayos clínicos: aleatorización, cegamiento y el análisis de las pérdidas (53). Como se comentó en material y métodos, el diseño del estudio fue ciego simple ya que el personal que administró el tratamiento conocía el tipo de medicamentos administrados. El efecto placebo en los sujetos en estudio se controló, ya que los pacientes en ambos grupos recibieron tratamiento, aunque el grupo experimental tuvo una intervención extra, la aplicación subcutánea de la EPO.

No obstante el personal involucrado en la determinación de las variables de resultado, mediciones duras al ser conteo celular, desconocía el grupo al que pertenecía cada muestra. Todos los pacientes se incluyeron en forma aleatoria, sin posibilidad de cambio en el tratamiento asignado y se analizaron para el objetivo principal del estudio.

Para disminuir el número de posibles confusores, se seleccionaron sólo pacientes pediátricos con leucemia aguda, que fueran candidatos a trasplante autólogo; para aumentar la factibilidad, se decidió incluir pacientes con leucemia mieloblástica y linfoblástica, suponiendo que la aleatorización lograría homogeneizar la población estudiada. Efectivamente, al analizar las características de los pacientes en el momento de inclusión del estudio se observó que ambos grupos fueron similares al momento del inicio del estudio. Pero, como se observa en el cuadro 1, en el grupo control parece ser que los pacientes tenían menor tiempo de tratamiento y de ciclos de quimioterapia, lo cual se asocia con el diagnóstico de leucemia mieloblástica en

primera remisión; pero esta diferencia no tuvo significancia estadística. Este hecho pudo haber influido para que en los pacientes del grupo experimental la cuantificación de las CMN, y en especial de las células CD34⁺ fueran más bajas que en el grupo control (22,54). Lo adecuado hubiera sido incluir solo pacientes con leucemia mieloblástica en primera remisión, que fueron los que más se beneficiaron con el trasplante en este estudio, de esta manera la muestra sería homogénea y se controla el número de tratamientos de quimioterapia previos que actúan como posible confusor. Al analizar por separado a los pacientes con leucemia mieloblástica de este estudio, encontramos una diferencia relativa entre grupos para CMN del 35% a favor del grupo control ($p= 0.61$) y del 33% a favor del grupo experimental para células CD34⁺ ($p = 1.0$). Aunque todos los pacientes injertaron, los del grupo experimental lo hicieron en menos días, con una diferencia absoluta de medianas de 6.5 días ($p = 0.548$) con similar número de días de internamiento a partir del inicio de la movilización (35 días, $p = 0.762$). Sin embargo para tener conclusiones definitivas, es necesario aumentar el tamaño de la muestra, que de acuerdo a un diseño bidireccional sería de 9 pacientes por grupo para la variable células CD34⁺ y 79 pacientes por grupo para el tiempo de internamiento a partir de la movilización.

Variable utilizada para el cálculo de tamaño de muestra

Las UFC-GM y las células CD34⁺ son las mediciones que se utilizan más frecuentemente para medir la capacidad de reconstitución hematopoyética de las células trasplantadas (29). Inicialmente, en los artículos relacionados con trasplante sólo reportaban UFC-GM; sin embargo, para su evaluación se requieren

aproximadamente dos semanas para obtener un resultado (3,16,19,25,30-32,43). En cambio, para la cuantificación de CD34⁺ el resultado se obtiene en pocas horas (48,55-57). En la actualidad, se conoce que usar una u otra técnica es similar, (27,40,41) siendo el tiempo para obtener un resultado, la única diferencia. Debido a que en los estudios anteriores se utilizó UFC-GM para evaluar el efecto de EPO, fueron estos resultados los que se seleccionaron para calcular el tamaño de muestra. El cálculo se realizó de acuerdo a un diseño unidireccional ya que al momento de iniciar el estudio, todos los reportes excepto un resumen, apoyaban el beneficio de la EPO. En los ensayos clínicos previos se detectó una diferencia de más del 50% en la cosecha celular, la cual nos pareció también clínicamente importante, con este valor se determinó que sólo era necesario la inclusión de siete pacientes por grupo. Para el cálculo del tamaño de muestra se utilizó, además de la diferencia entre grupos, un nivel alfa de 0.05 y un beta de 0.20. Con los datos anteriores pero de acuerdo a un diseño bidireccional, se requiere aumentar la muestra a 9 pacientes por grupo.

Error tipo II

El aceptar los resultados, conlleva a la probabilidad de cometer un error tipo II. Esto es poco probable en función que antes del inicio del estudio se calculó el tamaño de muestra con los elementos antes mencionados. A pesar de esto, con los resultados obtenidos en el estudio se realizó un nuevo cálculo del poder del estudio, el resultado fue del 60%. Considerando los hallazgos del estudio, este resultado del poder está orientado hacia una diferencia pero en favor del grupo control, más que al grupo experimental. Aceptando este resultado, también se estimó el número necesario para determinar que el grupo control es mejor que el experimental; de esta

forma, al aumentar el tamaño de muestra a más de diez pacientes por grupo, se podría comprobar que con el uso de EPO se disminuye la posibilidad de lograr mejores cosechas celulares, en el entendido que se mantuviera la misma tendencia de los resultados de la cuenta de células de CD34⁺ obtenidos en este estudio. Sin embargo es importante considerar el número de tratamientos previos como posible confusor y para controlarlo, al aumentar el tamaño de la muestra, también se debe homogeneizar más, incluyendo solo pacientes pediátricos portadores de leucemia mieloblástica en primera remisión y excluyendo leucemias secundarias.

Obtención del injerto

Aunque el enfoque del estudio fue hacia la determinación de la efectividad de las citocinas en la movilización de células de médula a ósea a sangre periférica. En este estudio también se evaluó el procedimiento completo del trasplante. Se observó que en los pacientes de ambos grupos se obtuvo el injerto, en forma independiente del número de células CD34⁺; también, que entre los pacientes del grupo experimental, en general, el injerto fue más temprano. Esto lleva a reflexionar sobre la utilidad del valor de la cuenta de CD34⁺ para determinar la probabilidad que en un paciente se obtenga el injerto. De acuerdo con estudios previos, la cuenta de células CD34⁺ en la cosecha predice la probabilidad de injerto (21,22,57); sin embargo, no se conoce la cantidad mínima de células CD34⁺ necesaria para alcanzar injerto en pacientes candidatos a trasplante autólogo. Pérez-Simón sugirió una cifra de $0.75 \times 10^6/\text{kg}$, no obstante, sus pacientes también injertaron con cifras menores (57). En este estudio el 25% de los pacientes la cuenta de células CD34⁺ fue inferior a $0.32 \text{ células} \times 10^6/\text{kg}$, y aún así se logró el injerto. Por otro lado, en este estudio el tiempo para

obtener el injerto fue mayor a lo reportado (3,12,19,25,27,31,32,43) probablemente porque no se utilizaron factores de crecimiento en el período post-trasplante para acelerar la recuperación de granulocitos (3,12,25,31,43). Sin embargo, al comparar los resultados de ambos grupos se observó que en el grupo experimental el injerto se obtuvo más tempranamente (con una mediana de diferencia de cuatro días).

Haber logrado injerto en forma independiente al número de células CD34⁺ se puede explicar por la presencia de células progenitoras hematopoyética CD34⁻, las cuales tienen la capacidad de auto-renovarse y ser activadas a células CD34⁺, que tienen la capacidad de diferenciación y proliferación (58). Por esta razón, surge la hipótesis sobre la conveniencia de identificar y cuantificar la población de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁻ para predecir mejor la obtención del injerto, pero al mismo tiempo nos cuestionamos si en nuestro medio es indispensable su determinación para realizar trasplantes de células progenitoras.

Al enfocarse el estudio más allá de sólo la cuantificación de las células CD34⁺ se logró identificar la incongruencia de los resultados con el estado de conocimiento actual. Sin embargo, estos hallazgos tienen ciertas implicaciones. Por un lado, la primera impresión es aseverar que la Eritropoyetina no produce los efectos esperados en la cosecha de células CD34⁺, y concluir que no debería utilizarse para el trasplante autólogo, sin embargo esta conclusión deberá definirse hasta completar una muestra homogénea que incluya solo pacientes con leucemia mieloblástica. Pero, desde el punto de vista de la obtención del injerto, con esta citocina en conjunto con el FEC-G se logró el injerto en forma más temprana; con este resultado la conclusión del uso de EPO sería a la inversa. Para el clínico es importante lograr el injerto, pero además, obtenerlo en el menor tiempo posible para acortar el tiempo

de neutropenia y disminuir el tiempo de hospitalización, por los riesgos asociados a ambas situaciones. De esta forma, la utilización de EPO en combinación con FEC-G parecería la mejor opción; sin embargo, para comprobar esta hipótesis se requiere de un estudio de costo-efectividad con un número mayor de sujetos para determinar si es esta combinación es mejor que el uso exclusivo de FEC-G.

Conclusiones

1. Con los resultados obtenidos en el presente estudio, la combinación de las citocinas Eritropoyetina y FEC-G para la movilización de células de la médula ósea a sangre periférica en niños con leucemia aguda sometidos a trasplante autólogo, produce efectos similares que el uso único de FEC-G.
2. Es posible que con el uso de la combinación de ambas citocinas, la cosecha de células CD34⁺ sea menor que cuando se utiliza únicamente FEC-G.
3. Es posible que el número de tratamientos previos haya actuado como un confusor.
4. Es conveniente continuar el estudio incluyendo solo pacientes con leucemia mieloblástica en primera remisión.
5. En ambos grupos se logró el injerto en forma independiente de la cuantificación de células CD34⁺.
6. Aunque sin significancia estadística, en el grupo que utilizó la combinación de las citocinas el injerto se logró de forma más temprana. Por esta razón se propone la realización de un estudio de costo-efectividad para determinar la verdadera utilidad de la combinación de Eritropoyetina y el FEC-G.

BIBLIOGRAFÍA

1. Creutzling U, Ritter J, Schellong G for the AML-BMF Study Group. Identification of two risk groups in childhood acute myelogenous leukemia after therapy intensification in study AML-BFM-78. *Blood* 1990; 75: 1932-40.
2. Dini G, Ablá O, Uderzo C, et al. Allogeneic bone marrow transplantation in children with acute myelogenous leukemia in first remission. *Bone marrow transplantation* 1994;13:771-6.
3. Fukuda M, Kojima S, Matsumoto K, Matsuyama T. Autotransplantation of peripheral blood stem cells mobilized by chemotherapy and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor childhood neuroblastoma. *Br. J. Haematol.* 1992 Mar;80 (3):327-31.
4. Thomas D, Rainer S, Technique for Human Marrow Grafting. *Blood* 1970;36(4):507-15.
5. Armitage J. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1994; 330(12):827-38.
6. Van Zant G, Rummel S, Koller M, et al. Expansion in bioreactors of human progenitor population from cord blood and mobilized peripheral blood. *Blood cells* 1994;20:482-91.
7. Petersen FB, Appelbaum FR, Hill R, et al. Autologous marrow transplantation for malignant lymphoma: a report of 101 cases from Seattle. *J. Clin. Oncol* 1990;8:638-47.
8. Haines ME, Goldman JM, Worsley AM, et al. Chemotherapy and autografting for chronic granulocytic leukaemia in transformation: probable prolongation of survival for some patients. *Br. J Haematol* 1984;58:711-21.
9. Gorin N, Aegerter P, Auvert B, y col. Autologous bone marrow transplantation for acute myelocytic leukemia in first remission: a European survey of the role of marrow purging. *Blood* 1990;75:1606-14.

10. Goodman JW, Hodgson GS. Evidence for stem cell in the peripheral blood of mice. *Blood* 1962;19:702-14.
11. Korbling M, Flledner T. The evolution of clinical peripheral blood stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation* 1996 Mar, 17 Suppl 2:S-4-11.
12. Faucher C, le Corroller , Blaise D, et al. Comparison of G-CSF-primed peripheral blood progenitor cell and marrow auto transplantation: clinical assessment and cost-effectiveness. *Bone marrow transplantation* 1994;14:895-901.
13. Watanabe T, Takaue ,Koyama T, Takaue Y, et al. Peripheral blood stem cells autotransplantation in treatment of childhood cancer. *Bone marrow transplantation* 1989;4:261-5.
14. Lasky L, Bostrom B, Smith J. Clinical collection and use of peripheral blood stem cells in pediatric patients. *Transplantation* 1989;47(4):613-6.
15. Yeager A. Autologous bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia. In: Forman S, editor. *Bone marrow transplantation.*, Boston: Blackwell scientific publications, 1994:709-30.
16. Pierelli L, Iacone A, Guaglietta A, et al. Hematopoietic reconstitution after autologous blood stem cell transplantation in patients with malignancies: a multicentre retrospective study. *Br. J Haematol* 1994;86:70-5.
17. To LB, Sheppard KM, Haylock DN, et al. Single high doses of cyclophosphamide enable the collection of high numbers of hemopoietic stem cells from the peripheral blood. *Exp hematol* 1989;18:442-8.
18. Kotasek DD, Shepherd KM, Sage RE, et al. Factors affecting blood stem cell collections following high dose cyclophosphamide mobilization in lymphoma, myeloma and solid tumors. *Bone marrow transplant* 1992;9:11-7.
19. Menichella G, Pierelli L, Scambia G, et al. Low dose cyclophosphamide in combination with cisplatin or epirubicin plus rhG-CSF allows adequate collection os PBSC for autotransplantation during adjuvant therapy for high risk cancer. *Bone marrow transplantation* 1994;14:907-12.

20. Lie A, Rawling T, Bayly J. Progenitor cell yield in sequential blood stem cell mobilization in the same patients: insights into chemotherapy dose escalation and combination of haematopoietic growth factor and chemotherapy. *Br J of Haematol* 1996;95:39-44.
21. Zeller W, Gutensohn K, Stockschröder M, et al. Increase of mobilized CD34⁺ positive peripheral blood progenitor cells in patients with Hodgkin's disease, non-Hodgkin's lymphoma, and cancer of testis. *Bone marrow transplantation* 1996;17:709-13.
22. Demirel T, Buckner CD, Gooley T, et al. Factors influencing collection of peripheral blood stem cell in patients with multiple myeloma. *Bone marrow transplantation* 1996;17:937-41.
23. Metha J, Powles L, Shepherd V. Transplantation of autologous peripheral blood stem cells mobilized using GM-CSF for acute leukemia with myelofibrosis. *Leukemia and lymphoma* 1993;11:157-8.
24. Knudsen M, Gaarsdal E, Jensen L, et al. Improved priming for mobilization of and optimal timing for harvest of peripheral blood stem cells. *J of Hematotherapy* 1996; 5(4):399-406.
25. Brice P, Divine M, Marolleau J.P, et al. Comparison of autografting using mobilized peripheral blood stem cells with and without granulocyte colony-stimulating factor in malignant lymphomas. *Bone marrow transplantation* 1994;14:51-5.
26. Weaver C, Birch R, Greco L, Schwartzberg L, et al. Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells: randomized evaluations of different doses of filgrastim. *Br J Haematol* 1998;100:338-47.
27. Hohaus S, Martin H, Wassmann B, et al. Recombinant human granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (G-CSF and GM-CSF) administered following cytotoxic chemotherapy have a similar ability to mobilize peripheral blood stem cells. *Bone marrow transplantation* 1998;22:625-30.

28. Thomas D. Bone marrow transplantation: a review. *Seminars in hematology* 1999;36(4):95-103.
29. To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 1997;89:2233-58.
30. Takaue Y, Watanabe T, Abe Y, et al. Experience with peripheral blood stem cell collection for autografts in children with active cancer. *Bone marrow transplantation* 1992;10:241-48.
31. Takaue Y, Watanabe T, Kawano Y, et al. Isolation and storage of peripheral blood hematopoietic stem cells for autotransplantation into children with cancer. *Blood* 1989;74:1245-51.
32. Alegre A, Díaz MA, Madero L, et al. Large -volume leukapheresis for peripheral blood stem cell collection in children: a simplified single-apheresis approach. *Bone marrow transplantation* 1996;17:923-7.
33. Leibundgut K, Hirt A, Luthy AR, Wagner HP, Tobler A. Single Institution experience with mobilization, harvesting, and reinfusion of peripheral blood cells in children with a solid tumor or leukemia. *Ped Hematol Oncol* 1994 Mar-Apr;11(2):215-21.
34. Takaue Y, Koyama T, Watanabe T, et al. In vivo dose-response effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on increase in granulocytes after peripheral blood stem cell autotransplantation. *Acta Haematol* 1989;81(4):210-12.
35. Deméocq F, Kanold J, Chassagne J, et al. Successful blood stem cell collection and transplant in children weighing less than 25 kg. *Bone marrow transplantation* 1999;13:43-50.
36. Lasky L, Bostrom B, Smith J, et al. Clinical collection and use of peripheral blood stem cells in pediatric patients. *Transplantation* 1989;47:613-6.
37. Lasky L, Fox S, Smith J, Bostrom B. Collection and use of peripheral blood stem cells in very small children. *Bone marrow transplantation* 1991;7:281-4.

38. Brugger W, Möcklin W, Heimfeld S, et al. Ex Vivo Expansion of Enriched Peripheral Blood CD34⁺ Progenitor Cells by stem Cell Factor, Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-3, Interferon-gamma, and Erythropoietin. *Blood* 1993;10(may15):2579-84.
39. Mayani H, Dragowska W and Lansdorp P. Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells. *Blood* 1993;12 (June 15):3252-8.
40. Pettengell R, Woll P, Chang J, et al. Effects of erythropoietin on mobilization of haemopoietic progenitor cells. *Bone marrow transplantation* 1994;14:125-30.
41. Pierelli L, Menichella G, Scambia G, et al. In vitro and in vivo effects of recombinant human erythropoietin plus recombinant human G-CSF on human haemopoietic progenitor cells. *Bone marrow transplantation* 1994;14:23-30.
42. Olivieri A, Offidani M, Cantori I, et al. Addition of erythropoietin to granulocyte colony-stimulating factor after priming chemotherapy enhances hemopoietic progenitor mobilization. *Bone marrow transplantation* 1995;16:765-70.
43. Kessinger A, Bishop MR, Jackson JD, et al. Erythropoietin for mobilization of circulating progenitor cells in patients with previously treated relapsed malignancies. *Experimental Hematology* 1995;23:609-12.
44. von Lintig F, Waller CF, Musahi V, et al. Mobilization of peripheral blood progenitor cells in patients with breast cancer: a prospective randomized trial comparing rhG-CSF VS RhG-CSF plus erythropoietin (EPO) after VIC-E chemotherapy (abstract). *Blood* 1996;88 suppl 1:408a.
45. Waller CF, von Lintig F, Daskalakis A, Musahi V, Lange W. Mobilization of peripheral blood progenitor cells in patients with breast cancer: a prospective randomized trial comparing rhG-CSF with the combination of rhG-CSF plus erythropoietin after VIP-E chemotherapy. *Bone marrow transplantation* 1999;24:19-24.

46. Krejci M, Hajek R, Koristek Z, Krivanova A, Navratil M, Adam Z. Haematopoietic stem cell mobilization in patients with multiple myeloma: comparison of 3 variations of the stimulating regime. *Vnitri Lekarstvi* 2000;46(8):439-43.
47. Miller CB, Lazarus HM. Erythropoietin in stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation* 2001;27(10):1011-6.
48. Siena S, Bregni M, Di Nicola M, et al. Cytofluorimetric determination of CD34⁺ cells: Milan protocol for clinical CD34⁺ cell estimation in peripheral blood for autografting in patients with cancer. In: Wunder E, Sovalat H, Hénon P, Serke S, Editors. *Hematopoietic stem cells, the mulhouse manual*. Ohio: AlphaMed press, 1994:21-30.
49. Reeb B. Dye exclusion test for bone marrow viability. In: Areman E, Joachim H, Sacher R, editores. *Bone marrow and stem cell processing: A manual of current techniques*. Philadelphia: F.A. Davis Company, 1994:403-4.
50. Second task force on blood pressure control in children. *Pediatrics* 1987;79:1
51. Pizzo PA. Fever in immunocompromised patients. *N Engl J Med* 1999;341(12):893-9.
52. Cummings S, Grady D, Hulley S. Designing an experiment: clinical trials I. In: Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady D, Hearst N, Newman TB, editors. *Designing Clinical Research. An Epidemiology Approach*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001:143-55.
53. Jadad AR, Moore RA, Carroll D, et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials* 1996 Feb;17(1):1-12.
54. Haas R, Mohle R, Fruhauf, et al. Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. *Blood* 1994;83:3787-94.
55. Arena G, Musto P, Cascavilla N, et al. Circulating CD34⁺ absolute cell number is the best single parameter to predict the quality of leukapheretic yield. *Bone marrow transplantation* 1998;22:215-6.

56. Chapple P, Prince HM, Quinn M, et al. Peripheral blood CD34⁺ cell count reliably predicts autograft yield. *Bone marrow transplantation* 1998;22:125-30.
57. Pérez-Simon JA, Caballero MD, Corral M, et al. Minimal number of circulating CD34⁺ cells to ensure successful leukapheresis and engraftment in autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Transfusion* 1998;38:385-391.
58. Goodell M. CD34⁺ or CD34⁻: Does it really matter?. *Blood* 1999;94:2545-7.

Cuadro 1. Comparación de las características de los pacientes en el momento de inicio del tratamiento.

	Todos	Grupo FEC-G	Grupo FEC-G + EPO	P
No. de pacientes	14	7	7	
Edad (años)	7.5 (3-16)	9 (4-16)	5 (3-15)	0.710*
Género (masculino/femenino)	6/8	4/3	2/5	0.592**
Diagnóstico				
LAM/LAL	10/4	6/1	4/3	0.559**
Peso (kg)	29 (14.5-48)	35 (17.3-44)	23 (14.5-48)	1*
Cursos de quimioterapia previos	12 (6-43)	8 (6-24)	23 (6-43)	0.209*
Tiempo de diagnóstico al trasplante (días)	458 (207-2030)	355 (207-1439)	702 (210-2030)	0.209*
Tiempo entre último curso de tratamiento y movilización (días)	49.5 (11-85)	73 (38-85)	41 (11-63)	0.073*

*Prueba de Mann Whitney

**Prueba exacta de Fisher

LAM = leucemia aguda mieloblástica, LAL = leucemia aguda linfoblástica.

Los valores numéricos se expresan en mediana; los valores entre paréntesis representan intervalos de confianza al 95%

Figura 1. Diagrama de flujo para el objetivo principal del estudio.

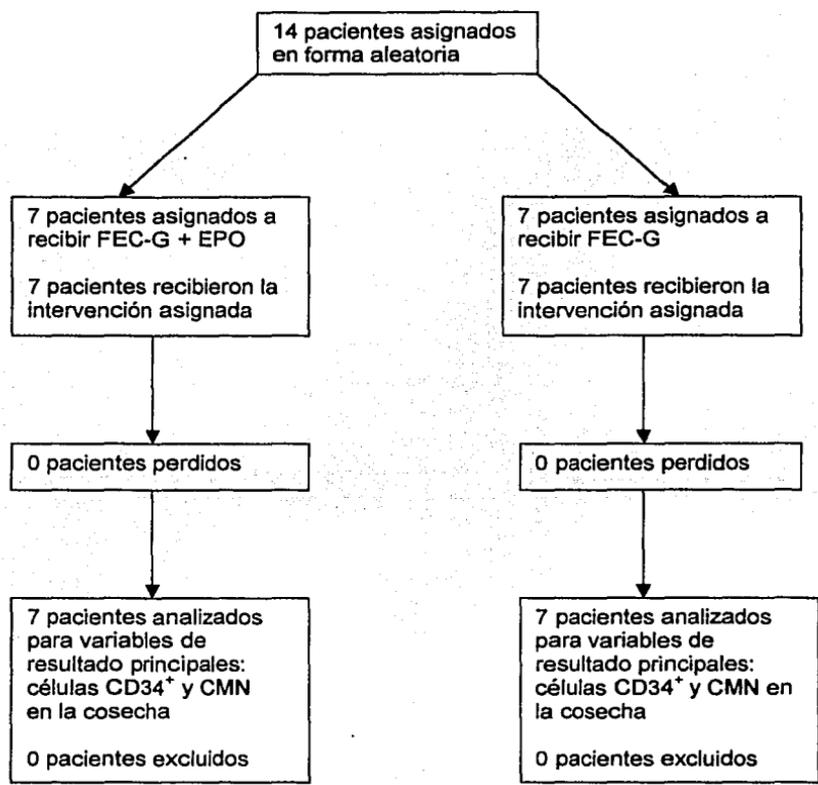
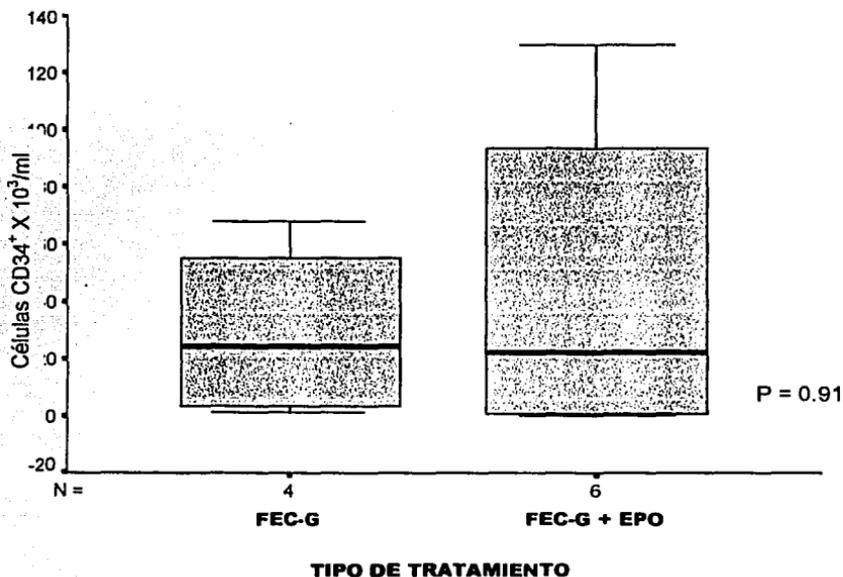
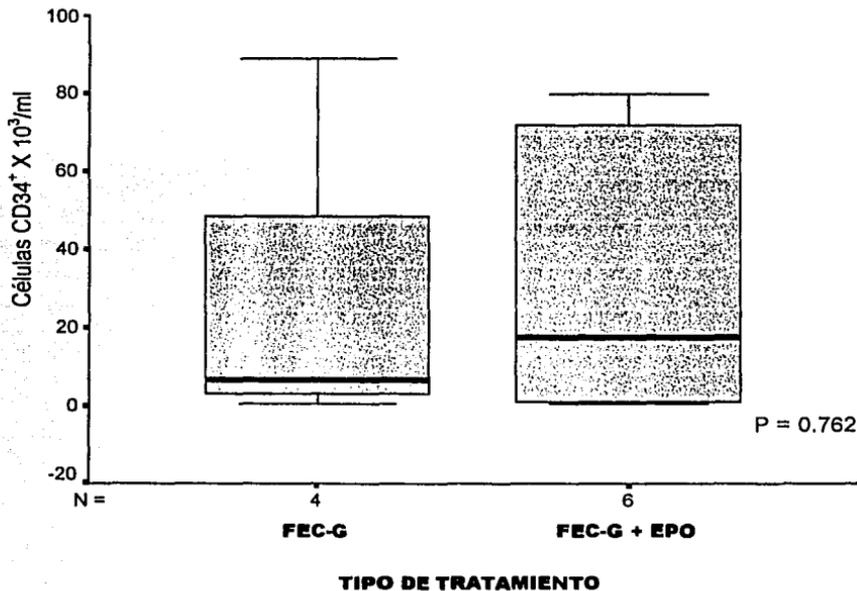


Figura 2. Comparación del número de células CD34⁺ en sangre periférica en el día - 6 del trasplante



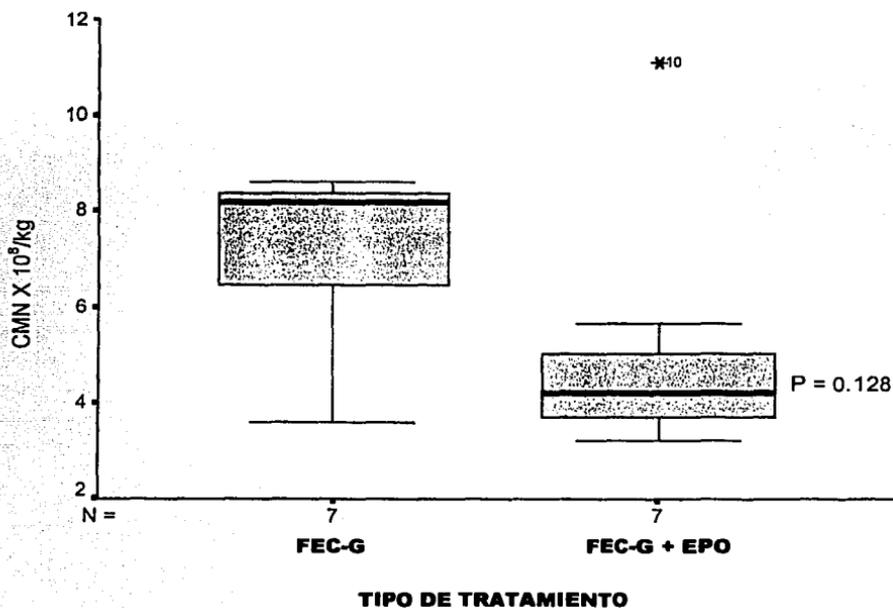
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 3. Comparación del número de células CD34⁺ en sangre periférica en el día - 5 del trasplante

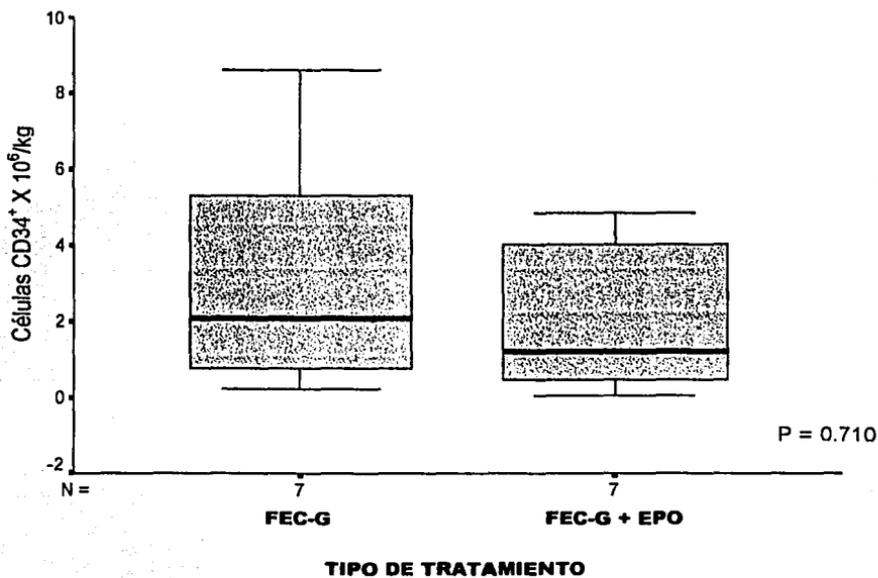


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 4. Comparación del número de células mononucleares en la cosecha

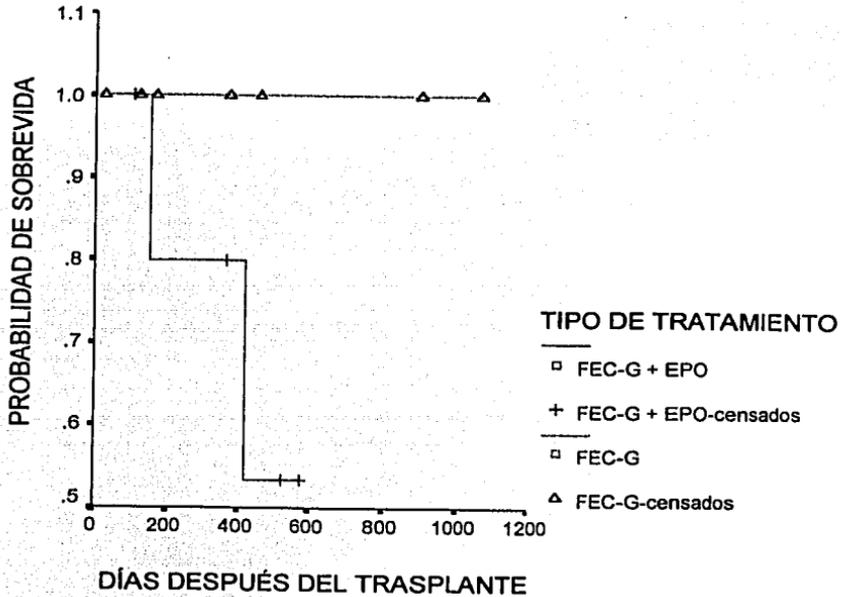


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 5. Comparación del número de células CD34⁺ en la cosecha

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 6. Sobrevida después del injerto



Log Rank $p = 0.157$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

62

ANEXO 4

ESTUDIOS REALIZADOS EN EL PACIENTE

	Fecha	TT	TPT	TP	Fib	Prot. Tot	Alb	Glob	Calcio
día	día/mes/año	seg	seg	%	mg	g/dL	g/dL	g/dL	mg/dL
-6pre									
-6post									
-5pre									
-5post									

ESTUDIOS REALIZADOS EN LA COSECHA CELULAR

	Fecha	CMN	LA RAZA	CANCEROLOGIA				
día	día/mes/año	10 ⁶	viab %	CMN 10 ⁶	CD34* 10 ⁶	viab %	Vol ml	
-6								
-5								
-4		////////	////////		////////			
-3		////////	////////		////////			
-2		////////	////////		////////			
-1		////////	////////		////////			
0								
1								

22