

INFUSIONES DE LINFOCITOS DE DADOR COMO INMUNOTERAPIA ADOPTIVA EN PACIENTES CON NEOPLASIAS HEMATOLOGICAS RECAIDOS POST TRASPLANTE ALOGENICO DE CELULAS PROGENITORAS HEMATOPOYETICAS

LEANDRO RIERA, BENJAMIN KOZINER

Unidad de Trasplante de Médula Osea, CEMIC, Buenos Aires

Resumen Un número creciente de publicaciones ha demostrado claramente que la infusión de linfocitos provenientes del dador original es capaz de reinducir remisiones en pacientes con recaídas luego de un trasplante alogénico de células precursoras hematopoyéticas. También se ha comunicado que la efectividad de la misma varía en las distintas patologías en la que se ha utilizado. Los mejores resultados se obtuvieron en leucemia mieloide crónica, con un rango de remisiones entre 60 y 80%, mientras que los pacientes con leucemia aguda mieloblástica o síndromes mielodisplásicos mostraron porcentajes de remisiones del orden del 20 a 40% y pacientes con mieloma múltiple un nivel de respuestas próximo a 40%. En cambio en leucemia aguda linfoblástica los resultados han sido por lo general desalentadores, con un rango de respuestas de apenas 10-20% y aun inferiores en algunas series. Dada la eficacia de las ILD en ciertas recaídas hematológicas post trasplante alogénico como se expondrá en detalle en esta revisión, es justificado anticipar la extensión de su indicación a pacientes recaídos no trasplantados y como terapia de mantenimiento de la remisión obtenida por quimioterapia convencional o a altas dosis.

Abstract *Donor lymphocyte infusions for the treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.* An increasing body of literature has documented the usefulness of donor lymphocyte infusions in inducing remissions in patients relapsing post allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation. Efficacy was shown to depend on the disease entity; the best results have been reported in chronic myeloid leukemia in chronic phase, where the remission rate varied between 60 and 80%. In acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes the remission rate ranged between 20 and 40% and in multiple myeloma the response rate was approximately 40%. In contrast, results have been poor in acute lymphoid leukemia with only 10-20% and even lower reported responses. Considering the efficacy of donor lymphocyte infusions in inducing responses in several hematologic neoplasias post allogeneic transplantation, as will be described in detail in this review, it is justified to anticipate an increasing role for this modality of treatment in relapsed non transplanted patients and as maintenance of the responses achieved with chemotherapy at conventional or high doses.

Key words: donor lymphocyte infusion, hematopoietic progenitor cell, bone marrow transplantation, T lymphocytes, natural killer cells, chronic myeloid leukemia, acute leukemias, multiple myeloma

El trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) es el tratamiento con mayor potencial curativo para diversas neoplasias hematológicas y el único recurso terapéutico disponible que permite una sobrevida libre de enfermedad prolongada en algunas de ellas, por ejemplo, la leucemia mieloide crónica (LMC)¹.

Este potencial se debe en gran medida al "injerto contra tumor", fenómeno inmunológico reconocido hace varios años y que es implementado por células T

inmunocompetentes maduras, contenidas en el producto celular^{2, 3}.

Sin embargo 10-50% de los pacientes sometidos a un trasplante alogénico eventualmente recaen, dependiendo del tipo y estadio de la enfermedad. Un número significativo de éstos pueden lograr remisiones prolongadas por medio de infusiones de linfocitos del dador (ILD).

Recibido: 14-9-99

Aceptado: 23-11-99

Dirección postal: Dr. Benjamín Koziner, CEMIC Saavedra, Galván 4102, 1431 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4546-8280 e-mail: bkoziner@netizen.com.ar

CPH Células progenitoras hematopoyéticas
ILD Infusión de linfocitos del dador
NK Células *natural killer*
CPA Células presentadoras de antígeno
LTC Linfocitos T citotóxicos
ICAM Moléculas de adhesión intercelulares
EICH Enfermedad injerto contra huésped
EBMT Grupo europeo de trasplante de médula ósea
IBMTR Registro internacional de trasplante de médula ósea

Células efectoras

Mecanismos de reconocimiento y citotoxicidad

Las poblaciones celulares capaces de identificar y destruir células malignas pueden clasificarse en dos categorías, que se diferencian básicamente por los mecanismos que intervienen en el proceso de reconocimiento celular. Estos son los linfocitos T citotóxicos (LTC) y las células natural killer (NK).

Linfocitos T citotóxicos

Los LTC se definen clásicamente como una población celular antígeno específica de fenotipo mayormente CD3⁺, CD8⁺, CD16⁻ que reconoce a las células blanco a través de péptidos presentados junto a moléculas de clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en la superficie de las células presentadoras de antígenos (CPA). Estos antígenos, procesados y presentados convenientemente por las CPA profesionales, se unen a receptores específicos en la superficie de los LTC.

Para que esta interacción sea eficaz es indispensable además la participación de células T helper que producen citoquinas e intervienen en otras interacciones celulares necesarias para una apropiada estimulación de las CPA. Estas deben también expresar moléculas co-estimuladoras, tales como las que integran la familia B7, ya que sin su presencia se produce anergia⁴. Varias comunicaciones han demostrado que las células neoplásicas suelen carecer de moléculas co-estimuladoras suficientes para una adecuada interacción celular, y en consecuencia esos individuos no tienen posibilidad de reconocer sus tumores⁵.

Es central para una activación eficiente de los LTC, el rol de las CPA. De éstas, las células dendríticas (CD) han sido estudiadas en detalle y son objeto de gran interés debido a su relevancia clínica. Se trata de células grandes, con prolongaciones citoplasmáticas, que expresan niveles altos de moléculas clase II del CMH, así como moléculas de adhesión tales como ICAM 1 y 3⁶ y moléculas co-estimuladoras (B7.1, B7.2, CD40, etc.)⁹. A tal punto es indispensable la presencia de estas moléculas, que luego del contacto del LTC con el antígeno, en ausencia de las mismas no sólo se produce anergia sino que puede sobrevenir la muerte celular^{7,9}. La importancia decisiva de las CD, se debe a su extraordinaria capacidad para iniciar respuestas de linfocitos T. Sus propiedades principales son: 1) captación, procesamiento y presentación de antígenos, 2) capacidad de migrar selectivamente a través de los tejidos y 3) potencial de interactuar, estimular y dirigir la respuesta linfocitaria^{9,10}.

La existencia de antígenos tumorales específicos es una condición ineludible para que se concrete la lisis de

células tumorales mediada por LTC. Hay evidencia de que tales antígenos existen. Por ejemplo, en neoplasias B y T, el reordenamiento de secuencias génicas de inmunoglobulinas o del receptor de células T, resultan en la producción de proteínas que pueden ser reconocidas como antígenos tumorales. Otros antígenos incluyen epítopes del virus de Epstein Barr (LNH-asociados a VEB), oncogenes (bcr-abl en LMC), etc.⁵

Ya sea que el reconocimiento antigénico se produzca sobre proteínas intactas o péptidos resultantes del procesamiento de tales proteínas, DNA u otro tipo de molécula y si se cumplen todas las condiciones señaladas más arriba, puede lograrse la estimulación y activación de LTC con eventual lisis de las células tumorales blanco.

Células natural killer

Esta población celular ha sido considerada tradicionalmente como inespecífica o no influida por antígenos del CMH. Actualmente se sabe que esto no es tal así, y que el reconocimiento de las células blanco por parte de las células NK está poderosamente influenciado por la expresión de antígenos HLA en dichas células blanco¹¹.

El inmunofenotipo de las células NK es CD3⁺, CD56⁺, CD16⁺. CD16 es el receptor del fragmento Fc, lo que permite el reconocimiento de células cubiertas por inmunoglobulinas. A partir de este receptor, las células NK intervienen en citotoxicidad mediada por anticuerpos. Además las NK secretan una serie de citoquinas (interferon alfa, factor de necrosis tumoral, GM-CSF, etc.), que tienen algunos efectos directos sobre las células tumorales, así como la capacidad de reclutar células efectoras. Las células NK pueden ser activadas por una variedad de citoquinas, fundamentalmente IL-2 e IL-12 que potencian su actividad citolítica.

El mecanismo de reconocimiento de las células blanco por las NK no está completamente elucidado. Sin embargo, recientemente fueron identificados receptores de superficie expresados por las células NK que reconocen moléculas HLA clase I. Estos receptores inhibitorios (KIR) reconocen alelos HLA-A, B y C^{5,12}. A partir de una interacción adecuada entre ambos, inician una señal inhibitoria que evita la lisis celular. Por otra parte, las células tumorales o infectadas por partículas virales que muestran subexpresión de antígenos clase I o expresan péptidos alterados son reconocidos, no se produce la señal inhibitoria por falta de estimulación de los KIR y son destruidas. Es necesaria la presencia de moléculas de adhesión, como se señaló para LTC, tales como ICAM 1, ICAM 3 y LFA 1^{5,6}. Todas las células NK expresan como mínimo un KIR, lo que resulta en tolerancia de estructuras celulares autólogas que tengan un nivel adecuado de expresión de antígenos HLA clase I.

Desde un punto de vista teórico, las células NK podrían reconocer y destruir poblaciones tumorales autólogas si tuvieran subexpresión de moléculas HLA clase I o si expresaran algún péptido alterado. Sin embargo, resulta claro que las células NK juegan un papel fundamental en las reacciones injerto contra leucemia en el marco del trasplante alogénico¹³.

Mecanismos de lisis celular

Luego de una adecuada estimulación, ambas poblaciones de células efectoras utilizan un mecanismo citolítico similar del cual han sido descritos dos variantes: la primera incluye la exocitosis de perforina y granzimas en el espacio extracelular en el sitio de adhesión a la célula blanco. La perforina produce perforaciones en la membrana de la célula que facilitan la lisis osmótica y permiten la introducción de granzimas que inducen apoptosis¹⁴; la segunda consiste en la expresión del ligando del antígeno Fas en la superficie de la célula efectora, que al combinarse con su contrarreceptor, el antígeno Fas en la célula tumoral induce la apoptosis celular¹⁵.

A partir de la dilucidación, al menos parcial, de los mecanismos de reconocimiento, activación y lisis celular por parte de las células efectoras, se comprende claramente que deben cumplirse todas las condiciones señaladas para que los LTC y NK puedan ejercer con eficacia su efecto citotóxico sobre las células tumorales. Pero además, en la medida que se avanza en el conocimiento de la biología de las poblaciones celulares tumorales, se han ido identificando una serie de mecanismos potenciales a través de los cuales las células malignas pueden escapar del reconocimiento inmunológico. Algunos afectan sólo a LTC, por ejemplo la ausencia de antígenos-tumorales específicos (reconocibles) o presentación inadecuada de los mismos, subexpresión de moléculas HLA clase I o la falta de moléculas de coestimulación. Otros influyen fundamentalmente sobre células NK, tales como la expresión de moléculas HLA clase I autólogas por parte de las células tumorales, o la presencia de inhibidores solubles de la función NK. Por último, algunos afectan por igual a ambas poblaciones de células efectoras. Se ha observado que algunas células tumorales son capaces de expresar el ligando de Fas y por lo tanto, al menos teóricamente pueden inhibir a las células T induciendo la apoptosis mediada por antígeno Fas¹⁶. Finalmente, la resistencia a la apoptosis de la célula blanco, también resulta en escape tumoral.

Infusiones de linfocitos del dador

Desde las primeras comunicaciones en los años 80, un creciente número de trabajos ha demostrado claramen-

te que la infusión de linfocitos provenientes del dador original es capaz de reinducir remisiones en pacientes con recaídas luego de un trasplante alogénico de CPH (TACPH). También pudo observarse que la efectividad de la misma varía en las distintas patologías en las que se ha utilizado. Los mejores resultados se obtuvieron en LMC en fase crónica, con un rango de remisiones entre 60 y 80%, mientras que los pacientes con leucemia aguda mieloblástica (LMA) o síndromes mielodisplásicos muestran porcentajes de remisiones del orden del 20 a 40% y pacientes con mieloma múltiple (MM) un nivel de respuestas próximo a 40%. En cambio, en leucemia aguda linfoblástica (LLA) los resultados han sido por lo general desalentadores, con un rango de remisiones de apenas 10-20% y aun inferiores en algunas series^{17, 26}.

La eficacia de las ILD está influida, además del tipo de enfermedad como acaba de señalarse, por otras variables tales como el estado evolutivo de la misma. Por ejemplo, en LMC los mejores resultados se obtienen en pacientes en recaída molecular y los más pobres en quienes se encuentran en fase acelerada o crisis blástica, asemejándose estos últimos en su comportamiento frente a las ILD, a las leucemias agudas. Esta situación parece vincularse en parte a la cinética de los linfocitos T infundidos.

El estudio pormenorizado de las quimeras ha permitido analizar y comprender el comportamiento de las distintas líneas celulares luego de las infusiones linfocitarias en pacientes con LMC recaídos post trasplante alogénico deplecionado de células T. En el trabajo de Baurman y col.²⁷ todos los pacientes analizados eran quimeras mixtas en el momento de la recaída. En la serie mieloide, 99-100% de los granulocitos maduros pertenecían al receptor, incluso un paciente que fue tratado en remisión hematológica mostró que casi 70% de los granulocitos derivaban del paciente y sólo 1/3 tenían su origen en hematopoyesis del dador. Respecto de los progenitores hematopoyéticos CD34⁺, también se observó que la mayoría pertenecían al receptor y por lo tanto, al menos en parte, integraban el clon maligno.

Sin embargo, un considerable porcentaje (10-20%) eran células CD34⁺ residuales del dador. Este aspecto tiene importancia clínica como se verá más adelante. En cuanto a las células linfoides, aunque la amplia mayoría de las células T provenían del dador en todos los casos, una minoría de células CD3⁺ tenían su origen en el receptor y lo mismo se observó a nivel de la población celular B.

En todos los pacientes que respondieron a las ILD se documentó un patrón evolutivo similar. Luego de un período de latencia de duración variable (5-13 semanas) se produjo en este grupo una disminución rápida y progresiva de todas las líneas celulares derivadas del receptor y la conversión a una quimera completa del dador en el lapso de 4-5 semanas. Este período fue similar

en todos los pacientes, independientemente del estadio evolutivo de la enfermedad y fue denominado período crítico de viraje. La conversión de la quimera mixta en completa incluyó además la desaparición absoluta del oncogen bcr-abl y de las células linfoides residuales del receptor.

Respecto del comportamiento de las células de estirpe linfóide en el marco de las recaídas post trasplante alogénico y a partir de las ILD, es importante destacar la existencia y el significado de una quimera mixta. Si las células T del dador son las que deben mantener el estado de remisión a través del efecto injerto contra leucemia, entonces su presencia durante la recaída implica que tal función inmune no fue cumplida eficientemente. Simultáneamente, la tolerancia inmunológica de las células T del dador hacia las células T del huésped, puesta de manifiesto por la existencia de una quimera mixta, también resultará en tolerancia a otras células huésped incluyendo las malignas^{27, 29}. Finalmente, la existencia de una minoría de células huésped que desaparece al alcanzar la remisión completa, es una observación que contradice el concepto de especificidad de la reacción injerto contra leucemia y sugiere que se trata de un proceso de alorreactividad más amplio, ya que en general se acepta que las células T en LMC son normales y no pertenecen al clon maligno³⁰.

Varios autores coinciden en la necesidad de obtener un quimerismo completo en todos los pacientes trasplantados con enfermedades neoplásicas, ya que la existencia de una quimera mixta de células T implica tolerancia, ausencia de efecto injerto contra leucemia y favorece la recaída^{27, 31, 32}. Siguiendo esta hipótesis, la infusión de linfocitos originados en el dador podría romper este estado de tolerancia y suprimir el crecimiento de células leucémicas y normales del huésped simultáneamente.

Contrariamente a lo que ocurre con las células linfoides, las células granulocíticas, eritroides y progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ son en su gran mayoría claramente derivadas del huésped. Cuanto mayor es la participación de la hematopoyesis del receptor en la quimera mixta, mayor será el período de latencia y mayor el tiempo necesario para alcanzar la remisión^{27, 33}. Es dable aceptar que el tiempo que insumirá la expansión clonal de las células del dador infundidas se verá necesariamente influido por la masa tumoral, ya que se requiere lograr una determinada relación de fuerzas entre las células efectoras y las células blanco para que el efecto contra leucemia tenga lugar y logre los resultados buscados.

Lo señalado en los párrafos anteriores explica, al menos parcialmente, por qué los pacientes portadores de leucemias agudas en general no responden a las ILD. Posiblemente se deba a la escasa influencia de la inmunoterapia frente a enfermedades con gran capaci-

dad proliferativa por una cuestión de tiempo, ya que en la mayoría de los casos se requieren 8-12 semanas y ocasionalmente aún más para que la ILD exhiba un efecto antitumoral evidente. Este período es indudablemente demasiado prolongado para un paciente con leucemia aguda. Por tal motivo, se aconseja en estos casos, así como en todos los que exista gran masa tumoral, el uso de quimioterapia previa. En una serie publicada por Verdonck²⁹ recientemente, los únicos pacientes recaídos con leucemia aguda que lograron remisiones duraderas con ILD fueron los que previamente respondieron a quimioterapia convencional.

Se ha establecido también que algunas características biológicas de los blastos leucémicos tienen influencia en el fracaso de las ILD. Más de 80% de las células leucémicas carecen de moléculas de coestimulación B7.1 y B7.2. Sin éstas no es posible lograr estimulación alogénica y en consecuencia se produce anergia e incluso apoptosis linfocitaria cuando la interacción entre la célula efectora y la célula blanco no es óptima, como se ha señalado más arriba.

Toxicidad

Se reconocen dos efectos tóxicos principales de las infusiones linfocitarias:

Mielosupresión: Se ha observado hasta en un 40% de los pacientes recuentos en sangre periférica inferiores a 1 000/mm³ para leucocitos, 20 000/mm³ para plaquetas o menos de 0.2% de reticulocitos^{18, 19, 26}. En casos de aplasia severa secundaria a ILD, la infusión de CPH del dador por lo general logra restablecer la hematopoyesis, salvo en pacientes con enfermedad injerto contra huésped (EICH) crónica severa, en los que el mecanismo de supresión medular posiblemente sea diferente²⁶.

Se ha postulado que la persistencia de hematopoyesis del dador del orden del 5% protege de aplasia severa post ILD³⁴. Desde luego que la presencia de células normales del huésped no evita la citopenia en razón de la amplia alorreactividad de la reacción injerto contra leucemia.

Una característica biológica importante de este proceso en los pacientes que obtendrán una respuesta completa, es que aparentemente se comporta en forma autónoma y una vez iniciado, solamente se detendrá con la desaparición de todas las células blanco, incluyendo aquellas que no formen parte del clon leucémico, tales como los linfocitos del huésped. Por lo tanto, luego de la erradicación absoluta de la hematopoyesis del huésped, la recuperación granulocítica, eritrocitaria y plaquetaria, dependerá de la disponibilidad de células stem residuales del dador que no se hubieran visto afectadas por la violencia del efecto injerto contra leucemia. Aunque ellas no están involucradas

en forma directa en la reacción inmune que se lleva a cabo, la presencia de citoquinas con capacidad citotóxica en el medio ambiente celular puede afectarlas en forma indirecta como observadores inocentes²⁷.

Por estas y otras razones varios autores han aconsejado la infusión de células progenitoras de sangre periférica (CPSP) movilizadas con G-CSF y contaminadas con linfocitos T y otras células efectoras. Esta estrategia garantiza además una rápida recuperación de la hematopoyesis en los casos en los que resulta conveniente el uso de quimioterapia antes de la inmunoterapia adoptiva^{35, 39}.

Enfermedad injerto contra huésped (EICH): Entre 40 y 60% de los pacientes tratados con ILD desarrollan EICH^{18, 19, 26}. Es leve (grado I) en 18%, moderada (grado II) en 24% y severa (grado III-IV) en 13% de los casos. La piel es el principal órgano de choque y se ve afectada en más del 90% de los casos, pero las alteraciones de funcionamiento hepático (60%) o el compromiso intestinal también son frecuentes²⁹.

Se han explorado distintas alternativas con el propósito de prevenir la EICH sin perder el efecto injerto contra leucemia. En este punto parece adecuado formular algunas precisiones sobre la base de las evidencias disponibles. Desde el primer momento llamó la atención de los investigadores, que el trasplante alogénico con CPSP presentaba un comportamiento igual al de células progenitoras de médula ósea (CPMO) en cuanto a la incidencia y severidad de la EICH aguda, a pesar que el producto infundido cuando se usan CPSP, contiene 10 veces más células T y 20-25 veces más células NK, comparado con el producto celular obtenido de médula ósea^{35, 40, 41}. Además se ha sugerido que existe ventaja de las CPSP sobre las CPMO respecto de la actividad antileucémica⁴².

Las manifestaciones clínicas de EICH aguda son consecuencia de una producción y liberación desregulada de citoquinas, que ocurre en forma de cascada y que esquemáticamente puede considerarse que consta de tres fases secuenciales⁴³. Fase 1, es iniciada por el régimen de acondicionamiento que induce reacciones inflamatorias en los tejidos del huésped. Esta fase obviamente no se cumple en el marco de las ILD. Esto posiblemente tenga relevancia clínica, ya que los eventos que en ella se desarrollan condicionan y potencian a través de la liberación de citoquinas inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral (FNT) alfa, IL-1 e IL-6 y mayor exposición de antígenos, las reacciones de la Fase 2^{44, 47}. En ésta se produce la activación de las células T aloreactivas del dador las que secretan varias citoquinas, predominantemente IL-2 e IFN gamma, llamadas de tipo 1, que pueden ser producidas tanto por las células CD4⁺ como CD8⁺ (Th1 y Tc1) y que inducen la producción de otras citoquinas inflamatorias, particu-

larmente IL-1 y FNT alfa^{43, 48}. Por otra parte, las citoquinas de tipo 2 (IL-4, IL10) producidas por células T de tipo 2 activadas (CD4⁺ Th2 y CD8⁺ Tc2) tienen efecto supresor sobre las reacciones inmunes mediadas por células T⁴⁷. Existe considerable evidencia que el desvío de las reacciones de tipo 1 hacia tipo 2 se asocia con menor incidencia de EICH aguda, aunque posiblemente favorezca la forma crónica de EICH⁴⁹. Como consecuencia de estas observaciones, la modulación de las citoquinas en la respuesta inicial de las células T del dador a los aloantígenos del huésped ha sido objeto de gran interés. Por el momento, este campo de investigación se encuentra a nivel experimental y su utilidad clínica debe ser evaluada⁵⁰.

Sin embargo, algunas respuestas surgieron inesperadamente cuando se comprobó en ratones que el uso de G-CSF produce una polarización parcial de las células T hacia el tipo 2, a pesar de la ausencia de receptores para G-CSF en las mismas^{51, 52}. Esto explica, al menos parcialmente, el comportamiento de las CPSP movilizadas en cuanto a EICH aguda en trasplantes alogénicos y proporciona un motivo adicional para el empleo de CPSP movilizadas con G-CSF y contaminadas con LTC, NK, CD, etc. en las ILD. Incluso se ha hipotetizado que si esta polarización afecta la reactividad injerto contra huésped, no puede descartarse que tenga influencia en la actividad injerto contra leucemia⁴².

Finalmente la Fase 3 consiste en una cascada compleja de múltiples efectores incluyendo citoquinas inflamatorias, LTC específicos, células NK, que son responsables finales de los efectos deletéreos observados en la EICH aguda⁴³.

Otro aspecto que varios autores han sugerido de relevancia en relación con la incidencia y severidad de EICH aguda en ILD, se refiere a la dosis de linfocitos CD3⁺ infundidos. En primer lugar, en las dos series más numerosas publicadas sobre este procedimiento, se indica que los pacientes con recaída manifiesta y gran actividad proliferativa responden mal a pesar del uso de dosis masivas de células T^{18, 19}.

Mackinnon³² fue quien inicialmente exploró la posibilidad de obtener un efecto injerto contra leucemia suficiente para lograr remisiones sin precipitar un EICH a través de la infusión de dosis bajas de linfocitos T, demostrando que 1x10⁷/kg es suficiente para obtener respuestas en pacientes con LMC recaídos post trasplante. Estos resultados fueron confirmados posteriormente por varios grupos^{29, 53, 55} que además han señalado la utilidad de la administración de dosis crecientes de linfocitos, aunque también parece haber coincidencia en que en ningún caso se justifica superar los 3x10⁸/kg, ya que a partir de ese nivel es que aumenta la incidencia de EICH aguda y como ya se señaló no existiría beneficio terapéutico, salvo posiblemente en MM²⁴.

Es importante destacar que puede observarse una mortalidad del 10-15% luego de las ILD como consecuencia de la toxicidad del procedimiento^{5, 56}.

Por último, algunos autores sostienen que la toxicidad de las infusiones aumenta cuanto más precozmente se emplean. Antes de los 6 meses post trasplante puede verse toxicidad severa con dosis tan bajas como $1 \times 10^6/\text{kg}$, mientras que después de los 2 años, dosis mucho mayores se toleran sin toxicidad significativa. También se sugiere en estas comunicaciones que cuanto más precozmente se utilizan las ILD, más eficaces resultan en cuanto a su efecto antineoplásico^{57, 58}.

Aplicación clínica

Las ILD se han utilizado básicamente en tres situaciones clínicas: a) convertir una quimera mixta en completa en el contexto de trasplantes alogénicos con regímenes de condicionamiento no mieloablativos conocidos como minitrasplantes; b) preventivamente para potenciar el efecto injerto contra leucemia en pacientes de alto riesgo de recaída sometidos a trasplantes deplecionados de células T; c) reinducir remisiones en pacientes con recaídas de neoplasias hematológicas post trasplante alogénico.

Modo de utilización

Gran parte de la toxicidad observada con las ILD se atribuye al empleo de altas dosis de células CD3⁺. Como se ha señalado en párrafos anteriores, cuando el producto tiene un contenido linfocitario superior a $3 \times 10^8/\text{kg}$ del paciente aumenta significativamente tanto la incidencia como la severidad de la EICH, mientras que con dosis relativamente bajas ($1 \times 10^7/\text{kg}$) se ha obtenido efecto injerto contra leucemia consistente. Incluso dosis aún más bajas del orden de $1 \times 10^5/\text{kg}$ o $1 \times 10^6/\text{kg}$, pueden ser suficientes en casos especiales, tales como ILD preventivas en pacientes en remisión y con quimera mixta estable o en pacientes con enfermedad residual mínima infundidos antes del año post trasplante. Pero también debe tenerse en cuenta que $1 \times 10^7/\text{kg}$ puede ser ocasionalmente una dosis insuficiente, por ejemplo en pacientes en recaída hematológica infundidos después de los 2 años post trasplante o en pacientes con MM que se-

gún la experiencia de algunos autores se benefician de dosis mayores^{22, 24, 29, 59}.

Por estos motivos varios grupos aconsejan la utilización de dosis crecientes, según el grado de respuesta y toxicidad con el propósito de alcanzar lo que denominaron la dosis celular efectiva (DCE)^{32, 53, 54}, esto es la dosis linfocitaria mínima capaz de lograr remisión en pacientes en recaída. Dazzi y col. compararon un régimen de dosis crecientes contra dosis masivas en 48 pacientes y observaron que quienes recibieron dosis crecientes tuvieron un 91% de respuestas, mientras que en el grupo que recibió dosis masivas se obtuvieron 67% de respuestas y con menor incidencia de EICH en el primero. La dosis total de células CD3⁺ infundidas fue igual en los dos grupos⁵⁴.

En base a estas consideraciones parece adecuada la utilización de dosis escaladas según la siguiente progresión: dosis inicial: $1 \times 10^7/\text{kg}$, progresando a $5 \times 10^7/\text{kg}$, $1 \times 10^8/\text{kg}$ y finalmente $3 \times 10^8/\text{kg}$.

El segundo aspecto importante en el empleo de ILD se refiere a la cronología de las mismas en los casos en los que esté indicado más de un procedimiento. En este sentido la práctica habitual es la infusión cada 12-16 semanas que es el tiempo necesario para evaluar la eficacia debido a la cinética de los linfocitos T infundidos²⁷. Por último los pacientes no deben tener evidencia de EICH y deben estar fuera de tratamiento inmunosupresor durante 4 semanas.

Análisis de las experiencias publicadas en enfermedades hematológicas

Leucemia mieloide crónica

Todas las experiencias comunicadas coinciden en que los mejores resultados con ILD se han obtenido en pacientes con LMC. También ha quedado suficientemente establecido que el principal factor predictivo de respuestas es el estado de la enfermedad al momento de la infusión. Los pacientes con recaída molecular o citogenética logran remisiones en más de 80% de los casos, mientras que quienes exhiben recaída hematológica en fase crónica alcanzan 60-70% de respuestas completas y por último los que se encuentran en fase acelerada o crisis blástica tienen un comporta-

TABLA 1.— Experiencia del EBMT e IBMTR con ILD

Autor	Nº pacientes	Dosis celx10 ⁸ /kg	EICH %	Mielosupresión %	Remisión completa %
Kolb ¹⁸	135	0.1-15	41	34	73
Collins ¹⁹	140	0.5-18.1	60	18.6	60

TABLA 2.— Recomendaciones de dosis de ILD en LMC

Recaída	Tiempo post TX (meses)	QT previa	Dosis inicial Cel. CD3+/Kg
Molecular	< 12	No	1x10 ⁵ -1x10 ⁶
Citogenética	> 12	No	1 x 10 ⁷
Hematológica	-	No	1x10 ⁷
Fase acelerada o crisis blástica	-	Sí	1x10 ⁷

TABLA 3.— Experiencia publicada con ILD y otras intervenciones inmunoterápicas en mieloma múltiple

Autor	Nº pacientes	Intervención	EICH	Respuesta
Abraham ⁶¹	1	Susp. CSP	Sí	Sí
Aschan ⁶⁶	2	ILD-IL2	1	1 con EICH
Bertz ⁶⁷	1	Susp. CSP, ILD, IFN α	Sí	Si
Collins ¹⁹	4	ILD	NE	2
Collins ⁶⁰	1	ILD-IFN α	Sí	Sí
Glass ³⁹	1	ILD	Sí	No
Kolb ⁶⁹	2	ILD	NE	NE
Lokhorst ²²	13	ILD	9 aguda 7 crónica	8
Orsini ⁷⁰	4	ILD-deplecionados de CD8+	3	3
Pavrod ⁷¹	1	IFN α	Sí	No
Tricot ⁷²	4	ILD	4	4
Zomas ⁷³	1	QT-ILD	No	Sí

NE: No especificado

miento similar a los pacientes con leucemias agudas, con porcentaje de respuestas que no superan el 20%. Las dos series más numerosas publicadas, una del EBMT comunicando la experiencia de 27 centros y otra del IBMTR que reúne la de 25 centros, coinciden en sus resultados y conclusiones (Tabla 1).

De acuerdo con todo lo expuesto pueden formularse las siguientes recomendaciones para pacientes con LMC en recaída post trasplante alogénico. En todos los casos se movilizará al dador con G-CSF (10 microg/kg/d/5 días), realizando la recolección al 5º día. También en todos los casos se recomienda adoptar el régimen de dosis escaladas de acuerdo al esquema antes enunciado. En Tabla 2 se sugiere sólo la dosis inicial según el estado de la enfermedad.

Finalmente son de gran interés los resultados obtenidos con IFN alfa en el tratamiento de los pacientes con LMC recaídos post trasplante alogénico, particularmente en aquellos con recaída molecular o citogenética, sobre todo las que se producen tardíamente (después de

dos años del trasplante)^{61, 63}. En estos casos las remisiones citogenéticas son similares a las obtenidas con ILD. Por tal motivo, Hígano y col.⁶² aconsejan un curso de 1 año con IFN alfa, con una dosis inicial de 3x10⁶U/m²/día y recurrir a ILD en caso de progresión de la recaída o ausencia de respuesta citogenética luego de transcurrido ese lapso. Se sugiere sólo la dosis inicial, según el estado de la enfermedad.

Mieloma múltiple

La primera evidencia clínica de la existencia de un efecto injerto contra mieloma surgió de la experiencia de Or y col.⁶⁴ en un paciente portador de plasmacitomas extramedulares múltiples recurrentes y paraproteína IgA resistente a quimioterapia convencional. Recibió un trasplante deplecionado de células T de un dador HLA idéntico seguido de ILD en dosis crecientes a intervalos semanales. Se logró la erradicación de todas las masas tumorales y normalización de los niveles plasmáticos de

Igs. El paciente estaba en remisión completa a los 4 años post trasplante.

Desde entonces varias publicaciones que incluyen un escaso número de pacientes, comunicaron la experiencia de distintos grupos con el empleo de ILD en pacientes recaídos post trasplante alogénico (Tabla 3).

Del análisis de estas experiencias surge que el porcentaje de respuestas con ILD promedia aproximadamente 50% de los casos. Sin embargo, estos trabajos no son estrictamente comparables dado que las poblaciones fueron heterogéneas. En algunos se utilizó sólo ILD, mientras que en otros se asociaron a IL-2 o IFN alfa y además las dosis celulares fueron variables.

El trabajo de Lokhorst²² que incluye 13 pacientes con MM recaídos post trasplante alogénico deplecionado de células T de un dador HLA idéntico es el más numeroso. Se administraron 29 infusiones utilizando un régimen de dosis escaladas 1×10^6 a 3×10^8 células T/kg. Hubo 8 respuestas, 4 parciales y 4 completas, con 10 pacientes vivos al momento de la publicación.

Aparentemente en pacientes con MM sería necesaria una dosis linfocitaria mayor respecto de las ILD en LMC. Así se aconseja –utilizando el régimen de dosis escaladas– una dosis inicial de 1×10^8 células CD3/kg. También se sugiere incrementar progresivamente la dosis hasta obtener algún grado de EICH^{22, 24, 29}.

Una estrategia potencialmente apropiada en pacientes recaídos podría ser: a) movilización del dador con G-CSF 10 microg/kg/día 5 días y recolección; b) ILD a la dosis inicial de CD3⁺ 1×10^6 /kg, esperar 6 semanas, c) si no hay respuesta, incrementar la dosis linfocitaria a $3-5 \times 10^6$ /kg, esperar 6 semanas, d) si no hay respuesta, incrementar la dosis a 1×10^9 /kg y asociar IFN alfa ± IL2, e) si no hay respuesta indicar quimioterapia (melfalan 100 mg/m^2 + ILD ± IFN alfa ± IL2. Esta sugerencia, sobre todo en lo que se refiere a la dosis de células T y el esquema de la misma, está condicionada a que el dador y paciente sean HLA idénticos.

Leucemia aguda

En general los resultados comunicados con ILD en leucemias agudas son pobres, con porcentajes de respuestas apreciablemente inferiores a los que se obtienen en LMC. No superan el 20% de los casos^{18, 19, 72, 74}.

Respecto de leucemia mieloblástica aguda (LMA) se ha sugerido que los distintos factores de riesgo, tales como la clasificación citogenética también son aplicables en relación a la eficacia terapéutica con las ILD⁷⁵.

En cuanto a leucemia linfoblástica aguda (LLA) los resultados han sido uniformemente malos, inferiores a los de LMA^{18, 19}. Sin embargo algunas publicaciones recientes han reportado remisiones de más de 24 meses

en pacientes tratados precozmente con recaída molecular o con enfermedad mínima^{76, 78}.

Sobre la base de la experiencia comunicada por varios grupos parece haber coincidencia sobre la conveniencia de utilizar ILD como tratamiento de consolidación a continuación de quimioterapia destinada a reducir masa tumoral^{29, 73, 75}. Incluso Verdonck²⁹ postula que la respuesta a la quimioterapia tiene valor predictivo respecto de la eficacia de la infusión linfocitaria.

Como ya se ha señalado en párrafos anteriores, las células tumorales suelen carecer de moléculas coestimulantes. En el caso de las leucemias agudas más del 80% de los blastos carecen de tales moléculas y esta característica ha sido considerada responsable, al menos en parte, de los pobres resultados obtenidos con ILD⁷⁹.

En los últimos años se han producido significativos avances en relación con el mayor conocimiento de la actividad biológica de GM-CSF. Se ha establecido que esta citoquina es el principal mediador de la proliferación, maduración y migración de las CD que cumplen un papel fundamental en la inducción de respuestas inmunes primarias y secundarias mediadas por células T^{80, 81}. Además se ha observado que GM-CSF es capaz de incrementar la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos⁸², así como la capacidad tóxica de los monocitos⁸³ y la inmunogenicidad de las células tumorales a través de una mejor presentación de antígenos⁸⁴.

Kolb y col.⁷⁹ exploraron el uso de GM-CSF luego de la ILD y células progenitoras en pacientes con LMA, LLA y LMC (CB). En 13 pacientes evaluables en LMA se obtuvo remisión completa con ILD en 1 de 3 pacientes, mientras que con el uso de células progenitoras periféricas y linfocitos del dador (CPSP-LD) más GM-CSF se obtuvieron remisiones en 7 de 10 pacientes tratados.

Se trataron 10 pacientes con LLA, 2 de 5 respondieron a ILD solamente, mientras 5 de 6 tratamientos con la combinación CPSP-LD y GM-CSF indujeron remisiones. Las respuestas fueron de corta duración en quienes no recibieron quimioterapia previa, pero se lograron respuestas duraderas en quienes se utilizaron las infusiones como tratamiento de consolidación.

En base a lo expuesto podría sugerirse el siguiente esquema terapéutico:

a) movilización del dador con G-CSF (10 microg/kg/día/5 días) y recolección.

b) recaída molecular o citogenética: ILD a la dosis inicial de 1×10^7 /kg CD3⁺, escalando progresivamente hasta 3×10^8 /kg, en la forma propuesta. Si fueran necesarias sucesivas infusiones, éstas se administrarían cada 8-12 semanas. A partir de 5×10^7 /kg células CD3⁺, agregar GM-CSF 10 microg/kg/día.

c) recaída hematológica: en primer lugar quimioterapia seguida por ILD a la dosis de 1×10^7 /kg células CD3⁺

seguido por post infusión GM-CSF a 10 microg/kg/día. Si no hay respuesta escalar la dosis cada 8-12 semanas.

Esta propuesta de tratamiento es también aplicable a pacientes recaídos con LMC en crisis blástica.

Perspectivas futuras

En razón de la alta incidencia y eventual severidad que la EICH tiene como complicación de las ILD, se han usado productos celulares deplecionados de células CD8⁺, con el propósito de reducir al máximo la incidencia de esta complicación^{72, 85, 86}. Sin embargo, debido a la gran superposición que existe entre EICH y efecto injerto contra leucemia es altamente improbable que sea posible prevenir la EICH sin perder efecto injerto contra leucemia⁷².

Una alternativa interesante es la transfección de linfocitos T seleccionados con un gen suicida sensible a ganciclovir, que pueden ser eliminados con facilidad en caso de EICH indeseable⁸⁷.

Dada la eficacia de las ILD en las recaídas hematológicas post trasplante alogénico como se ha expuesto en detalle, es justificado anticipar la extensión de su indicación en pacientes recaídos, no trasplantados y como terapia de mantenimiento de la remisión obtenida por quimioterapia convencional o a altas dosis.

Agradecimiento: A la Sra. Olga Galván por su colaboración en la elaboración de este material.

Bibliografía

- Clift RA, Storb R. Marrow transplantation for CML. The Seattle experience. *Bone Marrow Transplant* 1996; Suppl 3: S1-3.
- Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, et al. Antileukemic effect of graft versus host disease in human recipients of allogeneic marrow graft. *N Engl J Med* 1979; 300: 1068-73.
- Horowitz M, Gale R, Sondel P, et al. Graft versus leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 75: 555-62.
- Lanzavecchia A. Immunology. Licence to kill. *Nature* 1998; 393: 413-4.
- Negrin R, Storb R, Forman S. Bone marrow transplantation in malignant disease. ASH Educational Program Book 1998; p 342-370.
- Starling G, Egner E, Mc Lellan A, et al. Intercellular adhesion molecule-3 is co-stimulatory ligand for LFA-1 expressed on human blood dendritic cells. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2528-32.
- Schwartz R. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990; 248: 1349-56.
- Jenkins M. The ups and downs of T cell co-stimulation. *Immunity* 1994; 1: 443-6.
- Hart D. Dendritic cells: Unique leukocyte population which control the primary immune response. *Blood* 1997; 90: 3245-3287.
- Hart D, Calder V. Human dendritic cells: Function and cytokine production. Immunopharmacology of macrophages and other antigen presenting cells. Handbook of Immunopharmacology 1994; p. 63.
- Gumperz J, Phara P. The enigma of the natural killer cells. *Nature* 1995; 378: 245-8.
- Lanier LL. Natural killer cells: From no receptors to too many. *Immunity* 1997; 6: 371-8.
- Albi N, Ruggeri L, Aversa F, et al. Natural killer (NK) cell function and antileukemic activity of a large population of CD3⁺/CD8⁺ T cells expressing NK receptors for major histocompatibility complex class I after "three-loci" HLA-incompatible bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 87: 3993-4000.
- Kagl D, Lederman B, Burki K, et al. Cytotoxicity mediated by T cells and NK cells is greatly impaired in perforin deficient mice. *Nature* 1994; 396: 31.
- Oshimi Y, Oda S, Honda Y, et al. Involvement of Fas ligand and Fas mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *J Immunol* 1996; 157: 2909-15.
- Walker P, Saas P, Dietrich P. Role of fas ligand (CD95) in immune escape, the tumor cell strikes back. *J Immunol* 1997; 158: 4521-4.
- Kolb H, Schattemberg A, Goldman J, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 1990; 76: 2462-5.
- Kolb H, Schattemberg A, Goldman J, et al. Graft versus leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation working party for chronic leukemia. *Blood* 1995; 86: 2041-50.
- Collins R, Shpilberg O, Droboski W, et al. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1997; 15: 433-44.
- Slavin S, Naparstek E, Nagler A, et al. Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and rh-IL2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 87: 2195-204.
- Verdonck L, Lokhorst H, Dekker A, et al. Graft vs myeloma effect: two cases. *Lancet* 1996; 347: 880-1.
- Lokhorst H, Schattemberg A, Cornelissen J, et al. Donor leukocyte infusions are effective in relapsed multiple myeloma after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1997; 90: 4206-11.
- Tricot G, Vesole D, Jagannath S, et al. Graft-versus-myeloma effect: proof of principle. *Blood* 1996; 87: 1196-8.
- Mehta J, Singhal S. Graft vs myeloma. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 835-43.
- Dermine S, Mavroudis D, Jiang Y, et al. Immune escape from a graft versus leukemia effect may play a role in the relapse of myeloid leukemias following allogeneic marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 989-99.
- Kolb H. Adoptive immunotherapy in chimeras for the treatment of leukemia. ASCO Educational Book 1999; p 235-40.
- Baurman H, Nagel S, Binder T, et al. Kinetics of graft vs leukemia response after donor leukocyte infusions for relapsed chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1998; 92: 3582-90.
- Truitt R, Atasoylu A. Impact of pretransplant conditioning and donor T cells chimerism, graft vs host disease, graft vs leukemia reactivity and tolerance after BMT. *Blood* 1991; 77: 2515-23.
- Verdonck L, Petersen E, Lokhorst H, et al. Donor leukocyte infusions for recurrent hematologic malignancies after allogeneic bone marrow transplantation: Impact of infused and residual donor T cells. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 1057-63.

30. Haferlach T, Wikemann M, Nickening C, et al. Which compartments are involved in Philadelphia chromosome positive CML? An answer at the single cell level by combining May-Grünwald-Giemsa staining and FISH techniques. *Br J Haematol* 1997; 97: 99-106.
31. Mackinnon S, Barnett L, Heller G, O'Reilly R. Minimal residual disease is more common in patient who have mixed T cell chimerism after BMT for CML. *Blood* 1994; 83: 3409-16.
32. Mackinnon S, Papadopoulos E, Carabasi M, et al. Adoptive immunotherapy evaluating doses of donor leukocytes for relapse of CML after BMT: Separation of GVL response from GVHD. *Blood* 1995; 86: 1261-8.
33. Rapanotti M, Arcese W, Buffolino S, et al. Sequential molecular monitoring of chimerism in CML patients receiving DLI for relapse after BMT. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 703-7.
34. Keil F, Hass O, Fritsch G, et al. Donor leukocyte infusions for leukemic relapse after allogeneic marrow transplantation: Lack of residual donor hematopoiesis predicts aplasia. *Blood* 1997; 89: 3113-17.
35. Körbling M, Huh Y, Durett N, et al. Allogeneic blood stem cell transplantation: Peripheralization and yield of donor-derived primitive hematopoietic progenitor cells (CD 34⁺, Thy-1 dim) and lymphoid subsets, and possible predictors of engraftment and graft vs host disease. *Blood* 1995; 86: 2842-8.
36. Siegert W, Beyer J, Kingreen D, et al. Treatment of relapse after allogeneic bone marrow transplantation with unmanipulated G-CSF mobilized peripheral blood stem cell preparation. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 579-83.
37. Treuschel R, Bernier M, Stryckmans P, et al. Complete remission following donor PBSC after low dose cytarabine chemotherapy for early relapse of acute myelogenous leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 381-3.
38. Nachbaur D, Duba H, Feictinger, et al. Polychemotherapy combined with G-CSF mobilized donor buffy coat transfusion for granulocytic sarcoma after allogeneic BMT for AML. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 947-9.
39. Glass B, Majolino I, Dreger P, et al. Allogeneic peripheral blood progenitor cells for treatment of relapse after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 533-41.
40. Schmitz N, Bacigalupo A, Labopin M, et al. Transplantation of PBPC from HLA - identical sibling donors. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Br J Haematol* 1996; 95: 715-23.
41. Dreger P, Haferlach T, Eckstein V, et al. G-CSF mobilized PBPC for allogeneic transplantation safety, kinetics of mobilization and composition of the graft. *Br J Haematol* 1994; 87: 609-13.
42. Glass B, Uharek L, Hartung G, et al. Immunotherapeutic aspects of allogeneic peripheral progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: S3-S8, Suppl 3.
43. Ferrara J. The cytokine modulation of acute graft versus host disease. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: S13-S15, Suppl 3.
44. Xun C, Thompson J, Jennings C, et al. Effect of TBI, busulfan-cyclophosphamide or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic GVHD in H2 incompatible transplanted SCID mice. *Blood* 1994; 83: 2360-7.
45. Remberger M, Rindgen O, Markling L. TNF alfa levels are increased during bone marrow transplantation conditioning in patients who develop acute GVHD. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 99-104.
46. Eissner G, Kohlhuber F, Grell M, et al. Critical involvement of transmembrane TNF alfa in endothelial programmed cell death mediated by ionizing radiation and bacterial endotoxin. *Blood* 1995; 86: 4184-93.
47. Lichtman A, Krenger W, Ferrara J. Cytokine Networks. Graft vs Host Disease, 2nd ed, New York: Dekker 1997; p 179.
48. Seder RA, Le Gross GG. The functional role of CD8⁺ T helper type 2 cells. *J Exp Med* 1995; 181: 5-7.
49. Krenger W, Ferrara J. Graft versus host disease and the Th1/Th2 paradigm. *Immunol Res* 1996; 15: 50-73.
50. Fowler D, Gress R. Graft versus host disease a Th1 type process: regulation by donor cells of Th2 cytokine phenotype. Graft vs Host Disease. New York: M Dekker 1997; p 479.
51. Pan L, Delmonte J, Jalonen C, et al. Pretreatment of donors with G-CSF polarizes donor T Lymphocytes toward type 2 cytokine production and reduces severity of experimental GVHD. *Blood* 1995; 86: 4422-9.
52. Krenger W, Snyder KM, Byon JC, et al. Polarized type 2 alloreactive CD4⁺ and CD8⁺ donor cells fail to induce experimental acute GVHD. *J Immunol* 1995; 155: 585-93.
53. Dazzy F, Craddock C, Szydlo R, et al. Adoptive immunotherapy with donor lymphocytes for relapse of CML after allogeneic stem cell transplant: Factors influencing the effective cell dose (ECD). *Blood* 1998; 92: 494a (S1) 2635.
54. Dazzy F, Szydlo R, Craddock, et al. Adoptive immunotherapy for patients who relapse after allografting for CML: A comparison of two regimens for donor lymphocyte infusion. *Blood* 1998; 92: 653a, (S1) 2695.
55. Vitale C, Pitto A, Mingari C, et al. In vivo generation of patient specific cytotoxic T cell clones (CTL), following donor lymphocyte infusions (DLI) for CML after HLA genotypically identical BMT. *Blood* 1998; 92: 348b (S1) 4499.
56. van Rhee F, Savage D, Blacwell J, et al. Adoptive immunotherapy for relapse of CML after allogeneic BMT: equal efficacy of lymphocytes from sibling and matched unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 1055-61.
57. Jakubowsky A, Small T, Collins N, et al. Risk of acute and chronic graft versus host disease associated with time following HLA matched SBA-E-T cell depleted marrow grafts. *Blood* 1998; 92: 653a (S1) 2692.
58. Naparstek E, Nagler A, Or R, et al. Donor lymphocyte infusion (DLI) for prevention of leukemic relapse after T-cell depleted marrow transplants. *Blood* 1998; 92: 654a (S1) 2697.
59. Collins R, Pineiro L, Neumaitis J, et al. Transfusion of donor buffy coat cells in the treatment of persistent or recurrent malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *Transfusion* 1995; 35: 891-8.
60. Abraham R, Szer J, Bardy P, Grigg A. Early cyclosporine taper in high-risk sibling allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 773-7.
61. Pigneux A, Devergie A, Pochitaloff M, et al. Recombinant alfa IFN as treatment for chronic myelogenous leukemia in relapse after allogeneic bone marrow transplantation: a report from the Société Française de Greffe de Moelle. *Bone Marrow Transplant*. 1995; 15: 819-24.
62. Higano C, Chiclens D, Raskind W, et al. Use of alfa-2a-interferon to treat cytogenetic relapse of CML after marrow transplantation. *Blood* 1997; 90: 2549-54.
63. Arcese W, Goldman J, D'Arcangelo E, et al. Outcome for patients who relapse after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood* 1993; 82: 3211-19.
64. Or R, Mehta J, Naparstek E, et al. Successful T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation in a child

- with recurrent multiple extramedullary plasmacytomas. *Bone Marrow Transplant* 1992; 10: 381-2.
65. Aschan J, Lönnquist B, Ringden O, et al. Graft-versus-Myeloma effect. *Lancet* 1996; 348: 346.
 66. Bertz H, Burger JA, Kunzmann R, et al. Adoptive immunotherapy for relapsed multiple myeloma after allogeneic bone marrow transplantation (BMT): evidence for graft vs myeloma effect. *Leukemia* 1997; 11: 281-3.
 67. Kolb H, Mittermüller J, Hertenstein H, et al. Adoptive immunotherapy in human and canine chimeras-the role of interferon alfa. *Semin Hematol* 1993; 30 (Suppl 3) 37-9.
 68. Orsini E, Aleya E, Schlossman R, et al. Expansion of preexisting clonal populations following donor lymphocyte infusion for relapsed multiple myeloma allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1997; 90 (Suppl 1): 549a, 2446.
 69. Pavrod S, Sivakumaran M, Durrant S, Chapman C. The role of alfa interferon in the pathogenesis of GVHD. *Bone Marrow Transplant* 1992; 10: 477.
 70. Tricot G, Munshi N, Vesole D, et al. Graft versus myeloma effect: risk and benefits. Autologous marrow and blood transplantation: Proceedings of the Eight International Symposium, 1997; p 225.
 71. Zomas A, Stefanoudaki K, Fisis M, et al. Graft-vs-Myeloma after donor leukocyte infusion: Maintenance of marrow remission but extramedullary relapse with plasmacytomas. *Bone Marrow Transplant* 1998, 21: 1163-65.
 72. Helg C, Starobinski M, Jeannet M, Chapnis B. Donor lymphocyte infusion for the treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia and Lymphoma* 1998; 29: 301-13.
 73. Tzeng CH, Lin JS, Lee JC, et al. Transfusion of donor peripheral blood buffy coat cells as effective treatment for relapsed acute leukemia after transplantation of allogeneic bone marrow or peripheral blood stem cells from same donor. *Transfusion* 1996; 36: 658-90.
 74. Verfaillie C, Eisdorf D, Mc Glave P, et al. High dose donor mononuclear cell infusion in post transplant relapsed AML. *MDS. Blood* 1994; 84 (Suppl 1) 333a, 1319.
 75. Buzyn-Veil A, Belanger C, Audat F, et al. Sustained complete cytologic and molecular remission induced by DLI alone in an AML patient in relapse after BMT. *Br J Haematol* 1996; 92: 423-5.
 76. Slavina S, Naparstek E, Nagler A, et al. Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and IL-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 87: 2195-2204.
 77. Atra A, Millar B, Shepherd V, et al. DLI for childhood ALL relapsing after BMT. *Br J Haematol* 1997; 97: 165-8.
 78. Yazaki M, Andoh M, Ito T. Successful prevention of hematological relapse for a patient with Ph⁺ ALL after allogeneic bone marrow transplantation by DLI. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 393-4.
 79. Kolb H, Schmid C, Muth A, et al. Adoptive immunotherapy using donor cells and GM-CSF for recurrent acute leukemia and acute phase CML after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1998; 92 (Suppl 1): 344b, 4481.
 80. Young JW, Szabolcs P, Moore M. Identification of dendritic cell colony forming units among normal human CD34⁺ bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of GM-CSF and TNF alfa. *J Exp Med* 1995; 182: 1111-9.
 81. Armitage J. Emerging applications of recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor. *Blood* 1998; 92: 4491-4508.
 82. Masucci G, Wersäll P, Ragnhammar P, Mellstedt H. GM-CSF augments the cytotoxic capacity of lymphocytes and monocytes in antibody dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* 1989; 29: 288-92.
 83. Grabstein K, Urdal DL, Tushinski RJ, et al. Induction of macrophage tumoricidal by GM-CSF. *Science* 1986; 232: 506-8.
 84. Fischer HG, Frosch S, Reske K. GM-CSF activates macrophages derived from bone marrow cultures to synthesis of MHC class II molecules and to augmented antigen presentation function. *J Immunol* 1998; 141: 3882-8.
 85. Champlin R, Giralt S, Gajewski J. T-cells, graft versus host disease and graft versus leukemia innovative approaches for blood and marrow transplantation. *Acta Haematol* 1996; 95: 157-63.
 86. Aleya E, Canning C, Collins H, et al. Efficacy and toxicity of CD4⁺ donor lymphocyte infusion for treatment of relapsed CML after allogeneic BMT. *Blood* 1996; 88: (S1) 682-715.
 87. Munshi N, Govindarajan R, Drake R, et al. Thymidine kinase (TK) gen transduced human lymphocyte can highly purified remain fully functional, and are killed efficiently with ganciclovir. *Blood* 1997; 89: 1334-40.

Moreover the pathologist has to try to explain not only why the patient died but how he was able to live. As Boycott remarks: "I do not wonder that people die; that is easy enough. What I marvel at is that they go on living with bodies so maimed, disordered, and worn out". We must concern ourselves with processes which have got out of place, out of time, and out of tune, as well as with disorder of structure, for disease may be defined as merely a summation of chemical reactions that have gone wrong. [...]

Más aún, el patólogo tiene que tratar de explicar no sólo por qué murió el enfermo sino cómo era capaz de vivir. Como señala Boycott: "No me asombra que la gente muera; esto es suficientemente fácil. Lo que me maravilla es que continúe viviendo con cuerpos tan estropeados, desordenados y gastados". Nosotros debemos interesarnos en procesos que se han salido de lugar, del tiempo y desafiados, como así también con la estructura desordenada, porque la enfermedad puede definirse meramente como la suma de reacciones químicas que han salido mal.

William Boyd (1885-1979)

A Text-Book of Pathology. An Introduction to Medicine. 4th ed, Philadelphia: Lea & Febiger 1943, p 16