



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Facultat de Medicina**

**Linfoma Folicular Avanzado.  
Eficacia de la Quimioterapia IAPVP-16  
y Resultados del Autotrasplante Hematopoyético**

Tesis presentada por:  
**Rosario López Sánchez**

para optar al grado de  
Doctor en Medicina y Cirugía

Director de la tesis:  
**Dr. Jordi Sierra Gil**

En memoria de mi madre

A mi padre y mis hermanos

A Ana, Cristina, David, Elisa e Isabel

Al Dr.Jordi Sierra por su ayuda, soporte

y por sus directrices científicas, sin todo lo cuál esta tesis no hubiera sido posible

## AGRADECIMIENTOS

A todo el equipo médico y de enfermería del Servicio de Hematología Clínica y de la Unidad de Hematología Biológica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, por su dedicación al diagnóstico y tratamiento de los pacientes hematológicos, que son la base de este trabajo. Mención especial merecen la Dra. Brunet, el Dr. Martino, el Dr. Altés, la Dra. Sureda y el Dr. Nomdedéu por su apoyo personal y profesional, así como por su importante participación en la elaboración de los trabajos que configuran esta tesis.

A los pacientes, para quienes trabajamos.

Jordi Sierra Gil  
Professor Titular de Medicina  
Facultat de Medicina  
Unitat Docent de Sant Pau  
Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFICA,

Que ROSARIO LÓPEZ SÁNCHEZ ha realitzat personalment el treballs d'investigació que configuren la tesi doctoral titulada "**Linfoma folicular avanzado: eficacia de la quimioterapia IAPVP-16 y resultados del autotrasplante hematopoyético**". Aquesta tesi ha estat feta sota la meva direcció, he revisat el text, i considero que compleix les condicions necessàries per ser defensada davant el tribunal corresponent, amb la intenció d'assolir el grau de doctor.

El que faig constar, com es preceptiu, en Barcelona a 3 de setembre de 2003.



Dr. Jordi Sierra Gil

ÍNDICE	Pág.
Glosario de Abreviaturas	9
I. ANTECEDENTES Y MOTIVACIÓN DE LA TESIS	13
II. INTRODUCCIÓN	19
2.1. Linfoma folicular	21
2.1.1. Características generales	21
2.1.2. Diagnóstico y clasificación por estadios	28
2.1.3. Pronóstico	30
2.1.4. Tratamiento	33
2.2. Trasplante de progenitores hematopoyéticos en el linfoma folicular	44
2.2.1. Obtención de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica	44
2.2.2. Tratamiento "ex vivo" de la celularidad	46
2.2.3. Trasplante autogénico de progenitores hematopoyéticos en el linfoma folicular	48
2.2.4. Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos en el linfoma folicular	54
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
IV. PACIENTES Y MÉTODOS	63
4.1. Población estudiada	65
4.2. Aspectos analizados	66
V. RESULTADOS	67
5.1. Manuscrito número 1: <b>Tratamiento de rescate con quimioterapia tipo IAPVP-16 en pacientes con linfoma folicular refractario o en recaída</b>	
5.1.1. Resumen	69
5.1.2. Artículo	
5.2. Manuscrito número 2: <b>Movilización de células progenitoras a sangre periférica tras quimioterapia de rescate tipo IAPVP-16 y G-CSF en síndromes linfoproliferativos</b>	
5.2.1. Resumen	77
5.2.2. Artículo	
5.3. Manuscrito número 3: <b>Trasplante autogénico de progenitores hematopoyéticos en el linfoma folicular en fase avanzada</b>	
5.3.1. Resumen	85
5.3.2. Artículo	
5.4. Otras publicaciones relacionadas con esta tesis	93
VI. DISCUSIÓN	95
VII. CONCLUSIONES	107
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AcMo	Anticuerpo monoclonal
AEHH	Asociación Española de Hematología y Hemoterapia
ARA-C	Arabinósido de citosina
BEAM	BCNU, etopósido, Ara-C y melfalán
2-CdA	Cladribina
CFU-GM	Unidad formadora de colonias granulo-monocíticas
CHOP	Ciclofosfamida, vincristina, adriamicina y prednisona
Col.s.	Colaboradores
CVP	Ciclofosfamida, vincristina y prednisona
d	Día
DFC	Deoxicoformicina
DFCI	Dana Faber Cancer Institute
DHAP	Dexametasona, cisplatino y Ara-C
EBMT	Grupo Europeo de Trasplante Hemopoyético
ESHAP	Etopósido, metilprednisolona , cisplatino y Ara-C
FBMTG	Grupo Francés de Trasplante Hemopoyético
FCM	Fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrone
FM	Fludarabina y mitoxantrone
FMD	Fludarabina, mitoxantrone y dexametasona
g	Gramo
G-CSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas
GELA	Grupo de Estudio de los Linfomas del Adulto
GELCAB	Grupo para el Estudio de los Linfomas de Cataluña y Baleares
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas y monocíticas
Gy	Gray
HSCSP	Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
IAPVP-16	Ifosfamida, Ara-C , prednisona y etopósido
IBMTR	Registro Internacional de Trasplante de Médula Ósea
IFN	Interferon
Kg	Kilogramo
l	Litro
LA	Leucemia aguda
LF	Linfoma folicular
LH	Linfoma de Hodgkin
LNH	Linfoma no-hodgkiniano
m	Metro
MDACC	M.D. Anderson Cancer Center
MIME	Metilprednisolona, ifosfamida, metotrexato y etopósido
µg	Microgramo
µl	Microlitro
ml	Mililitro
MO	Médula ósea
MRT	Mortalidad relacionada con el trasplante
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PH	Progenitores hematopoyéticos
RC	Remisión completa
RP	Remisión parcial
SG	Supervivencia global
SLP	Supervivencia libre de progresión

<b>SMD</b>	Síndrome mielodisplásico
<b>SP</b>	Sangre periférica
<b>SWOG</b>	Southwest Oncology Group
<b>TAC</b>	Tomografía axial computarizada
<b>TPH</b>	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
<b>UAB</b>	Universitat Autònoma de Barcelona
<b>UNESCO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura
<b>VP-16</b>	Etopósido

**NOTA:** Las imágenes y figuras incluidas en la presente tesis proceden de fuentes ajenas, por lo que se han solicitado las correspondientes autorizaciones.

## I. ANTECEDENTES Y MOTIVACIÓN DE LA TESIS





Las neoplasias linfoides son la contrapartida maligna de los linfocitos normales en sus distintas etapas de diferenciación. Las leucemias linfoides se originan en la médula ósea, y maduran en los tejidos linfoides. Los linfomas aparecen por transformación maligna de las células que residen en los tejidos linfoides periféricos. En las últimas décadas se ha observado un aumento constante de la incidencia de linfomas no-hogkinianos (LNH) tanto en Europa como en Estados Unidos, sin que exista una clara explicación para este hecho.

Los LNH indolentes, cuyo prototipo es el LF, son neoplasias linfoides diferenciadas incurables con tratamiento quimio-radioterápico convencional. El linfoma folicular (LF) se origina en la zona centrofolicular del ganglio linfático y su frecuencia corresponde aproximadamente a una tercera parte del total de LNH. Muchos de los pacientes con LF responden inicialmente al tratamiento de primera línea, pero la mayoría recaen y las siguientes remisiones obtenidas con terapia estándar son cada vez más difíciles de alcanzar y de duración más breve. Se han estudiado diversas estrategias de tratamiento con el objetivo de mejorar estos dos aspectos. Tradicionalmente, la terapia de rescate más efectiva en el LF incluyó combinaciones de ifosfamida, etopósido, arabinósido de citosina (Ara-C), y cisplatino. En la actualidad, existen nuevas modalidades de tratamiento, basadas en la utilización de análogos de las purinas o anticuerpos monoclonales (AcMo), que se han asociado a resultados esperanzadores.

Como consolidación de la respuesta obtenida con la quimioterapia de rescate, se ha extendido el uso del trasplante hematopoyético; es decir, dosis muy alta de quimioterapia asociada o no a radioterapia, seguida de la administración de células madre hemopoyéticas, precisas para superar la mielodepresión intensa y prolongada subsiguiente. Estas células pueden proceder de un donante HLA-compatibles (trasplante alogénico) o del propio paciente (trasplante autogénico), y obtenerse de la médula ósea o de la sangre periférica.

El trasplante hematopoyético autogénico se ha utilizado eficazmente en diversas neoplasias hematológicas, entre ellas algunos tipos de LNH agresivos. En los últimos años, este procedimiento se ha investigado también en pacientes diagnosticados de LF con resultados prometedores. Por otro

---

lado los avances en las medidas de soporte de dichos procedimientos han disminuido su morbimortalidad. Otro avance destacable ha sido el empleo de células progenitoras de sangre periférica en lugar de médula ósea, ya que su obtención es más cómoda y el período de pancitopenia posterior al trasplante es más breve. Con todo, todavía existen muchos interrogantes acerca de este procedimiento. En los pacientes con LF no se conoce cuál es la quimioterapia de rescate idónea o el momento oportuno para la realización del trasplante. Además, debido al curso generalmente indolente de estas neoplasias, el tiempo de seguimiento de los pacientes en la mayor parte de los estudios es insuficiente. Por ello se desconoce el impacto real del trasplante sobre la supervivencia global.

Mi interés personal por el estudio de las hemopatías malignas se inició ya como estudiante de Medicina. Me parecía una materia apasionante en la que se unían aspectos biológicos y clínicos. El campo de los LNH, complejo pero en plena expansión de nuevos conocimientos (conceptuales, patogénicos y terapéuticos), resultó el más atractivo para mí. Una vez obtenida la licenciatura accedí a una plaza de médico interno residente en el Departamento de Hematología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP), centro universitario en el que también había cursado mis estudios. Durante mi formación como especialista, concretamente en los períodos de rotación por el Servicio de Hematología Clínica y por la Unidad de Hematología Biológica, tuve la oportunidad de profundizar en el estudio citopatológico, clínico y terapéutico de los LNH. Despertaron en mí un particular interés los pacientes con linfoma en recaída o refractario a la terapia convencional, así como los resultados prometedores que se obtenían con la terapia de rescate diseñada en el HSCSP, IAPVP-16 (ifosfamida, Ara-C, prednisona y VP-16), con posterior trasplante autogénico. Una vez finalizado el período de formación, dirigida y animada por el equipo médico del Servicio de Hematología Clínica del HSCSP, en especial por el Dr. Jordi Sierra, Jefe de Servicio, realicé los trabajos que son la base de la actual Tesis Doctoral. Las conclusiones extraídas nos han ayudado, sin duda, a mejorar las estrategias terapéuticas de los pacientes con LF.

En la presente Tesis Doctoral se exponen tres trabajos, publicados en los años 1999 y 2000, sobre los resultados obtenidos con el esquema poliquimioterápico IAPVP-16, en términos de eficacia antitumoral y movilizadora de progenitores hematopoyéticos, y de un posterior autotrasplante, en pacientes con LF refractario o en recaída. Los trabajos se han realizado en el Servicio de Hematología Clínica (Departamento de Hematología) del HSCSP, gracias al importante número de pacientes que se atienden con estas características y a la experiencia profesional de su equipo médico. El HSCSP posee una larga trayectoria asistencial e investigadora. Es el hospital más antiguo de Cataluña y los edificios que ocupa actualmente son de gran valor histórico y artístico. Los orígenes del Hospital se remontan a 1401, cuando se fundó el Hospital de la Santa Creu (administrado por la Iglesia y los representantes de la ciudad). A finales del siglo XIX los avances de la medicina y la necesidad de atender a un gran número de enfermos justificaron la construcción de un nuevo hospital, el actual HSCSP, que se realizó gracias al legado de Pau Gil, banquero catalán afincado en París. Al arquitecto Lluís Domènech i Montaner debemos lo que es uno de los monumentos paradigmáticos del modernismo catalán y el "art nouveau" europeo. En 1930 el rey Alfonso XIII inauguró oficialmente el nuevo hospital. En 1997 fue declarado patrimonio de la humanidad por la UNESCO.

El HSCSP es un hospital universitario adscrito a la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) y en su recinto permanece la Unidad Docente de Sant Pau de la Facultad de Medicina. En la actualidad, tras la rehabilitación del edificio de la Casa de Convalecencia, también se encuentra en el HSCSP la Escuela de Postgrado de la UAB y la Biblioteca Josep Laporte. Todo ello hace de este centro uno de los complejos asistenciales, docentes y de investigación de mayor importancia en Europa. En julio de 2003 se inauguró la primera fase del nuevo HSCSP, que sin duda será un centro puntero de la sanidad catalana del siglo XXI.

El Servicio de Hematología Clínica tiene una amplia experiencia tanto en el tratamiento de las neoplasias linfoides como en el trasplante de progenitores hematopoyéticos. Ya en 1976 el Dr. Andreu Domingo-Albós realizó en este centro el primer trasplante de médula ósea de España. Desde

---

entonces se han realizado cerca de 1500 trasplantes en los servicios de Hematología Clínica, Pediatría y Oncología Médica. Las personas que han participado en los trabajos presentados pertenecen al Servicio de Hematología Clínica y a la Unidad de Hematología Biológica del HSCSP, así como al Laboratorio de Criobiología y Terapia Celular del Centre de Transfussió i Banc de Teixits de Barcelona.

## **II. INTRODUCCIÓN**



## 2.1. Linfoma folicular

### 2.1.1. Características generales

#### Definición

El linfoma folicular (LF) es una neoplasia derivada de los linfocitos B maduros presentes en la zona centrofolicular del ganglio linfático, normalmente constituido por centrocitos y centroblastos. Puede considerarse el prototipo de los linfomas indolentes, llamados así por su crecimiento lento y la rareza en la invasión de los tejidos no linfoides.

#### Histología y patogenia

El LF se caracteriza por un patrón infiltrativo nodular que remeda el folículo del ganglio linfático normal. La proliferación tiene su origen en la zona centrofolicular del ganglio y las células son de estirpe B (figura 1 y 2).

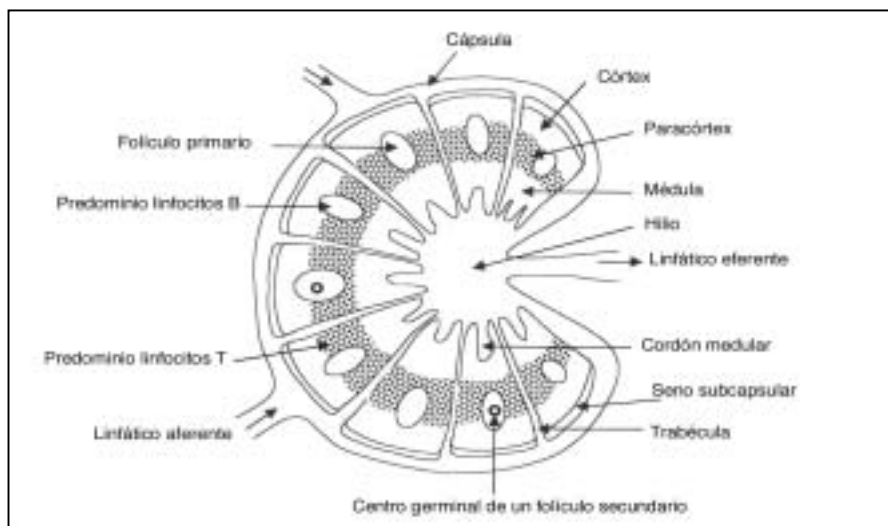


Figura 1. Esquema de la estructura anatómica de un ganglio linfático. Tomado de "La citología óptica en el diagnóstico hematológico." S. Woesnner y L. Florensa.



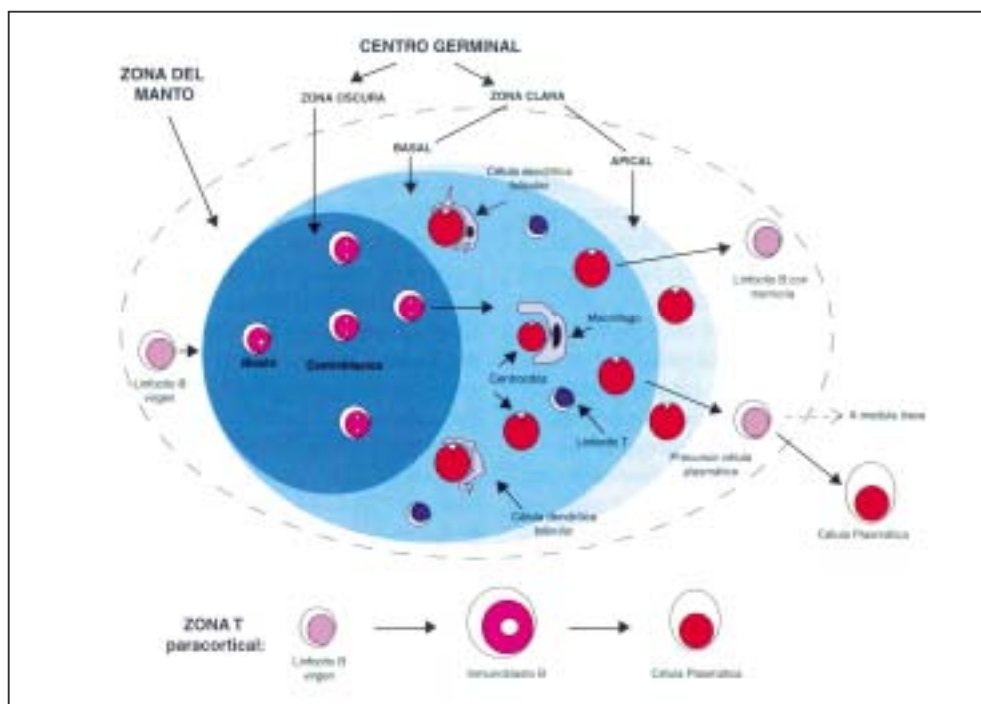


Figura 2. Esquema de la transformación de los linfocitos B en el folículo linfático secundario Tomado de "La citología óptica en el diagnóstico hematológico." S. Woesnner y L. Florensa.

La morfología celular corresponde a células pequeñas y medianas (centrocitos), con núcleo irregular y hendido, y cromatina densa (figura 3 y 4). También existen algunas células grandes (centroblastos), la proporción de las cuáles permitiría dividir el LF en 3 grados según la clasificación propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Esta clasificación utiliza la proporción entre centrocitos y centroblastos; así, el grado I correspondería a un porcentaje de centroblastos menor al 25 %, el grado II a una porcentaje entre el 25% y el 50% y el grado III a una proporción de centroblastos superior al 50%.<sup>1,2</sup>



Figura 3 y 4. Linfoma folicular: histología de ganglio donde se observa el patrón folicular ( imagen izq.) Linfoma folicular: leucemización en sangre periférica ( imagen der.) Imágenes tomadas del Fondo de Imagen en Hematología de la AEHH.

El inmunofenotipo del LF es positivo para marcadores B como CD 19, CD 20, CD 22 CD 23, y CD 38, también para CD10 e inmunoglobulinas de superficie (en la mayor parte de los casos Ig M); y negativo para los marcadores CD 5, CD 43 y CD 13c.<sup>1,2</sup> Las características inmunológicas nos ayudarán a diferenciar el LF de otras neoplasias linfoides B indolentes (tabla 1).

Tabla 1. Inmunofenotipo en las neoplasias linfoides B indolentes

Marcadores	CD20	CD22	CD10	CD5	CD23	IgS/IgC
<b>Histología</b>						
LF	+	+	+	-	-/+	+/+
LLC-B	+	+	-	+	+	+*/+
LZM	+	+	-	-	-	+/+
LLP	+	+	-	-	-/+	+/+
LM	+	+	+	+	-/+	+/+
TL	+	++	-	-	-	+/-

LF:linfoma folicular; LLC-B: leucemia linfática crónica B; LZM: linfoma de la zona marginal; LLP: linfoma linfoplasmocítico; LM: linfoma del manto; TL: tricoleucemia; \* intensidad débil.

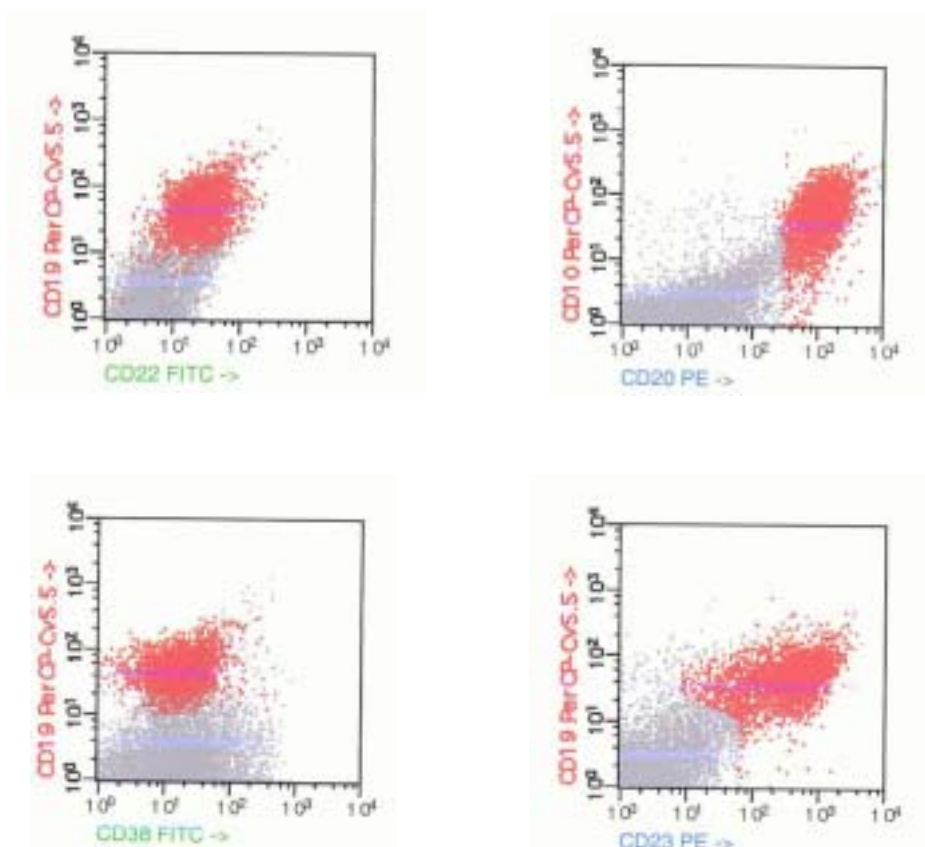


Figura 5. Patrón característico del linfoma folicular (color rojo) por citometría de flujo.

En lo referente a la citogenética, alrededor de un 80-90% de casos de LF presenta la traslocación recíproca (14;18)(q32;q21). De este modo se produce el reordenamiento del gen BCL-2 (localizado en el brazo largo del cromosoma 18) que se yuxtapone al gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgH) localizado en el cromosoma 14. El punto de rotura en el cromosoma 18 puede producirse en 2 regiones. Aproximadamente en un 70% de los casos la rotura ocurre en la “major breakpoint region” o MBR y en un 10% en la “minor breakpoint region” o mcr.

Esta traslocación coloca al oncogén BCL-2 bajo la influencia del promotor del gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, que provoca que el gen BCL-2 se transcriba continuamente y codifique para una proteína de membrana que se localiza en la mitocondria, retículo endoplásmico y membrana perinuclear. Ello motiva una sobreexpresión de la proteína BCL-2 en los linfocitos portadores de la alteración molecular, cuyo principal efecto es la inhibición de la muerte

celular programada o apoptosis celular. Las células con esta alteración no pueden entrar en apoptosis, prolongan su supervivencia y se acumulan. BCL-2 es sólo un miembro de la familia de los genes que regulan la apoptosis, como son también BAX y BCL-X.

La proteína BCL-2 forma parte de un complejo de alto peso molecular generado por la heterodimerización con la proteína BAX. La relación entre BCL-2 y BAX determina la actividad funcional de BCL-2. Cuando existe un exceso de BAX, dominan los homodímeros de BAX y la muerte celular está acelerada. Por el contrario si BCL-2 está en exceso predominan los heterodímeros de BCL-2/BAX y la muerte celular se detiene.<sup>3,4</sup>

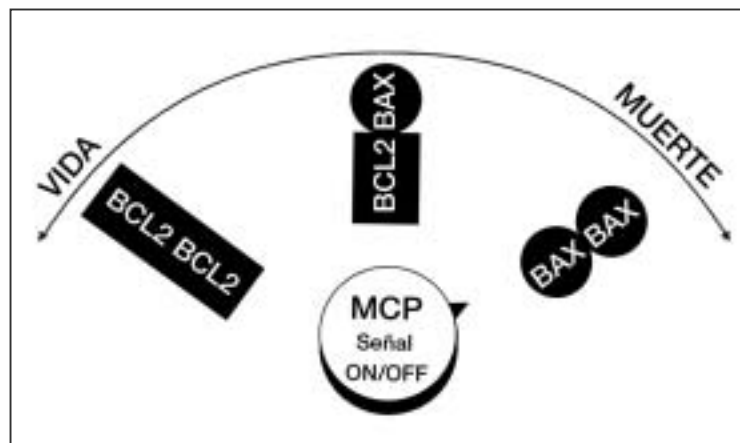


Figura 6. La proporción relativa de BCL-2 y BAX determina la susceptibilidad a la muerte celular programada. Tomado de Korsmeyer.<sup>4</sup>

La contribución precisa de BCL-2 en el desarrollo del LF es compleja. Al parecer, la traslocación de BCL-2 generaría un patrón de hiperplasia folicular de linfocitos maduros con supervivencia prolongada, ya que quedarían en la fase celular G0. A pesar de la similitud morfológica con el LF se diferenciaría de éste por la monoclonalidad de la celularidad en el caso del linfoma. La activación del gen BCL-2 no es suficiente para el desarrollo del linfoma. Deben existir otras lesiones genéticas, como deleciones del cromosoma 6, o factores relacionados con el huésped, como una

estimulación antigénica crónica, para que la hiperplasia folicular se convierta en una enfermedad neoplásica.

Es de destacar que existen casos de LF que no presentan dicha traslocación o en los que ésta ocurre entre los cromosomas 14 ó 18 y otros cromosomas como las traslocaciones t(2;18)(p12;q21) y t(8;22)(q21;q21). También se ha encontrado el reordenamiento de BCL-2 en linfocitos de individuos normales.<sup>5-8</sup> Por otro lado, en la progresión a un linfoma agresivo, la citogenética puede mostrar alteraciones secundarias como la trisomía 7, trisomía 12, alteraciones en el brazo largo del cromosoma 1 y en el brazo corto del cromosoma 17. En el análisis molecular pueden encontrarse mutaciones de la proteína p53, inactivación de la proteína p16 y reordenamientos del gen c-MYC.<sup>7-9</sup>

## Epidemiología

Como se ha mencionado anteriormente, en las últimas décadas se ha constatado un aumento constante de la incidencia de los LNH, principalmente de los linfomas indolentes, tanto en Europa como en Estados Unidos, sin que exista una explicación evidente para esta observación.<sup>5,10</sup> Los linfomas indolentes comprenden aproximadamente la tercera parte de todos los linfomas y el linfoma folicular es considerado el prototipo.

Existen pocos estudios sobre la frecuencia de LNH realizados en nuestro medio. En 1997 se publicó uno de ellos, llevado a cabo por Salar et al<sup>11</sup> del Instituto Catalán de Oncología. En dicho estudio se analizó la incidencia de neoplasias linfoides en el área de referencia de dicho centro hospitalario, entre los años 1993-95. La incidencia que correspondió a neoplasias linfoides B fue de 15,1 nuevos casos por 100.000 habitantes y año.

Los factores predisponentes que explicarían un aumento de la incidencia de linfomas agresivos serían el aumento de la prevalencia de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana y la creciente utilización de fármacos inmunodepresores. En cuanto al aumento de linfomas

indolentes, algunos investigadores apuntan como causa el uso de herbicidas y pesticidas. En el caso del LF, existe un estudio epidemiológico ocupacional que halló una frecuencia aumentada en algunas profesiones relacionadas con la construcción, como pintores, carpinteros, y otras.<sup>5</sup>

### Historia Natural

El LF es propio de personas de edad media y avanzada (mediana de 60 años) con igual incidencia según el sexo y comportamiento poco agresivo. Afecta a los ganglios linfáticos y con frecuencia también a la médula ósea. La afectación extranodal es rara. Habitualmente, el paciente presenta al inicio adenomegalias en una o más regiones ganglionares y puede tener síntomas B como pérdida de peso, fiebre y sudoración. La mayoría de los pacientes se diagnostican en un estadio avanzado.



Figura 7. Paciente mostrando adenopatías axilares. Fondo de imágenes del Servicio de Hematología Clínica del HSCSP.

Un fenómeno característico es la transformación a formas histológicas más agresivas, lo que empeora el pronóstico de estos pacientes. Este hecho se ha relacionado con la aparición de nuevas alteraciones moleculares, con frecuencia en p53 ó p16.<sup>5,6</sup>

### 2.1.2. Diagnóstico y estudio de extensión

El diagnóstico del LF se establece mediante el estudio anatomopatológico de la biopsia ganglionar, complementado con el estudio inmunofenotípico y molecular.

En todos los pacientes de nuevo diagnóstico se debe hacer una exploración física completa, con especial atención a la presencia de adenomegalias y/o hepatoesplenomegalia. Los estudios complementarios deben incluir: hemograma con fórmula leucocitaria, enzimas hepáticos, lactato deshidrogenasa sérica, urea, creatinina y  $\beta$ 2-microglobulina, tomografía axial computarizada (TAC) de tórax, abdomen y pelvis (que pondrán de manifiesto la existencia de afectación de los ganglios linfáticos torácicos y/o abdominales) y una biopsia de médula ósea.



Figuras 8 y 9. TAC abdominal con presencia de infiltración hepática en forma de nódulos (imagen izq.) y en el que se observan múltiples territorios ganglionares afectados (imagen der.) Imágenes tomadas del Fondo de Imagen en Hematología de la AEHH.

---

La clasificación por estadios utilizada es la de Ann Arbor (tabla 2), desarrollada en su inicio para el linfoma de Hodgkin. El 75% de los pacientes con LF se diagnostica en estadios III-IV.<sup>5</sup>

**Tabla 2. Determinación del estadio de los linfomas. Sistema de Ann Arbor**

---

<b>Estadio I</b>	Afectación de una sola región ganglionar o extraganglionar.
<b>Estadio II</b>	Afectación de dos o más regiones ganglionares del mismo lado del diafragma o extraganglionar localizado y una o más regiones ganglionares del mismo lado del diafragma.
<b>Estadio III</b>	Afectación de regiones ganglionares a ambos lados del diafragma, que puede acompañarse de lesión localizada de un área extraganglionar, bazo o ambos.
<b>Estadio IV</b>	Afectación diseminada de una o más regiones extraganglionares distantes con o sin patología ganglionar asociada.
<b>A o B</b>	Denota la ausencia (A) o presencia (B) de alguno de los siguientes síntomas: pérdida de peso inexplicada > 10%, sudoración vespertina o fiebre inexplicada.
<b>E</b>	Denota enfermedad extraganglionar.

---



### 2.1.3. Pronóstico

#### 2.1.3.1. Patrón de supervivencia

Antes de la aparición del tratamiento quimioterápico, el 50% de los pacientes diagnosticados de LF fallecían antes de 5 años. Si bien una minoría de pacientes con enfermedad localizada se puede curar, los casos en estadio avanzado se consideran incurables con el tratamiento estándar. Actualmente, la mediana de supervivencia es de aproximadamente 10 años. A pesar de la alta proporción de respuestas con el tratamiento inicial, entre el 80 y el 90%, la recaída del LF es la norma, tras una mediana de duración de la remisión de 2,5 años. Con recaídas sucesivas, las respuestas favorables al tratamiento disminuyen y la duración de éstas menor. La mediana de supervivencia tras una segunda respuesta es de sólo 5 años. El progresivo descenso en la proporción de respuestas y el acortamiento de su duración se debe a enfermedad residual resistente que no se eliminó con el tratamiento previo.<sup>12,13</sup> Por otra parte, durante el curso de la enfermedad, el LF puede transformarse a un linfoma agresivo, lo que confiere mal pronóstico, con una mediana de supervivencia menor de 12 meses.<sup>5,12</sup>

#### 2.1.4.2. Factores pronósticos

Como se ha mencionado, el LF es una enfermedad incurable a excepción de los casos localizados. En los estadios avanzados (III-IV) hallamos un grupo de enfermos con evolución clínica diferente, algunos con larga supervivencia y otros que no responden al tratamiento y fallecen rápidamente. Por ello, es importante distinguir desde el principio estos diferentes tipos de pacientes y definir grupos de bajo o alto riesgo, tributarios de recibir una terapia distinta.

Muchos investigadores han identificado numerosas variables clínicas al diagnóstico asociadas a un pronóstico desfavorable, las más importantes son: el sexo masculino, la edad

avanzada, el estado general afectado, el estadio avanzado (III-IV), la presencia de síntomas B, la afectación extraganglionar, la infiltración medular, la existencia de enfermedad "bulky" (voluminosa), la anemia, así como la elevación de LDH y/o de  $\beta$ 2-microglobulina.<sup>5,12,13</sup> El grupo francés GELA presentó un trabajo en el que identificaba 3 variables pronósticas independientes: presencia de síntomas B, edad superior a 60 años y presencia de al menos 3 regiones adenopáticas con adenopatías mayores de 3 cm.<sup>14</sup> Aspectos morfológicos como el porcentaje de centroblastos, o a la actividad mitótica, no se han aceptado de manera universal como factores pronósticos.

En la última década diversos estudios han presentado nuevos parámetros biológicos al diagnóstico con posible valor pronóstico en los linfomas indolentes. Entre ellos, marcadores plasmáticos como la timidincinasa, moléculas de adhesión en su forma soluble como sICAM-1, sVCAM-1 y sCD44, interleucinas como IL-6 e IL-10, el factor de necrosis tumoral o TNF y el receptor del TNF.<sup>15</sup> También marcadores moleculares, especialmente el reordenamiento del gen BCL-2, cuya ausencia parece tener un valor pronóstico negativo,<sup>16</sup> o mutaciones de p53 que también se asocian a un mal pronóstico. Diversas alteraciones cromosómicas, como la delección homocigota de 9p21 y la ganancia del cromosoma 7, se han identificado como marcadores de progresión a linfoma de alto grado, así como marcadores de proliferación celular como el antígeno Ki-67. Respecto a estos nuevos parámetros, en la actualidad no existen conclusiones definitivas ya que las series estudiadas son en general pequeñas, heterogéneas e integradas por diferentes subtipos histológicos. Uno de estos nuevos parámetros, aisladamente en cada subtipo de LNH, tiene un valor pronóstico limitado. Por ello son necesarios estudios con mayor número de pacientes y realizados en subtipos histológicos concretos.<sup>15</sup>

Algunos grupos han desarrollado índices pronósticos, a partir de variables obtenidas en sus propios estudios. Romaguera et al construyeron un índice a partir del sexo y una estimación de la masa tumoral; así, conferían un mal pronóstico el sexo masculino, más de una localización extranodal, adenopatías mayores a 5 cm y la afectación medular extensa<sup>17</sup>; Leonard et al<sup>18</sup> basaron su índice en el sexo, la edad, el estado general, el estadio y el nivel de la hemoglobina.

---

El IPI (índice pronóstico internacional), utilizado inicialmente en LNH agresivos, se ha utilizado ampliamente en los LF.<sup>19</sup> Las variables que lo componen son: edad mayor de 60 años, estado general conservado (ECOG 0-1) frente a deteriorado (ECOG 2-4), estadio localizado (I-II) frente a avanzado (III-IV), aumento de la LDH y presencia de dos o más afectaciones extranodales. Este índice divide a los pacientes en cuatro grupos: bajo riesgo, con ninguna o una variable desfavorable; riesgo intermedio-bajo, si presentan dos variables desfavorables; riesgo intermedio-alto, si presentan tres, y riesgo alto si existen cuatro variables desfavorables. En el trabajo realizado por López-Guillermo et al se estudiaron 125 pacientes diagnosticados de linfoma indolente. La proporción de respuestas y la supervivencia en cada grupo se describen en la tabla siguiente. Entre los dos grupos de riesgo intermedio no existieron diferencias estadísticamente significativas. Posiblemente el índice más utilizado en la práctica clínica actualmente sea el IPI, pero aún no se considera con suficiente poder discriminatorio para determinar de forma generalizada una opción terapéutica distinta según el grupo de riesgo. El valor de la  $\beta$ 2-microglobulina podría añadir más información a este índice.<sup>20</sup>

Otro índice pronóstico ha sido publicado recientemente por el Italian Lymphoma Intergroup (ILI), éste valora la edad, el sexo, el número de afectaciones extranodales, la presencia de síntomas B, el aumento de LDH y la velocidad de sedimentación globular.<sup>21</sup>

Actualmente el Proyecto Internacional sobre Factores Pronósticos en el LF (que recoge 3000 pacientes procedentes de estudios multicéntricos) está desarrollando un nuevo modelo predictivo que pueda ser una guía para la elección del tratamiento más adecuado en cada paciente según su riesgo.<sup>22</sup>

Finalmente, la mayor parte de estudios ha demostrado que la respuesta al tratamiento, y en concreto la obtención de una remisión completa, es el factor más importante para predecir una larga supervivencia libre de enfermedad.<sup>5,13,23</sup> De manera particular, la obtención de una remisión completa molecular, es decir, la negativización de reordenamiento del gen BCL-2 en los pacientes que lo

presentaban al diagnóstico, se asocia a supervivencia libre de enfermedad prolongada en la mayoría de pacientes.<sup>24</sup>

Tabla 3. Respuesta y supervivencia de 125 pacientes según IPI

Grupo de Riesgo	Todos los pacientes (N = 125)		Linfoma Folicular (N = 107)	
	RC (%)	Supervivencia a 10 años (%)	RC (%)	Supervivencia a 10 años (%)
Bajo	60	73,6	61,5	75
Intermedio-bajo	35	45,2	41,2	47
Intermedio-alto	23	53,5	25	55
Alto	21	0	21,4	0

Tomado de López-Guillermo et al<sup>19</sup>

#### 2.1.4. Tratamiento

Muchos grupos apoyan un tratamiento inicial del LF poco tóxico, ya que se trata, en la mayoría de casos, de una enfermedad incurable con quimioterapia, con un comportamiento indolente y con una supervivencia prolongada. No obstante, el mal pronóstico que adquiere después de la recaída obliga en ese momento a un tratamiento más intensivo, con la intención de obtener periodos libres de enfermedad lo más duraderos posible.

##### 2.1.4.1. Tratamiento inicial

Las opciones de tratamiento inicial del LF son diversas, se resumen en la tabla 4 y 5, y se describen a continuación.

### **No-tratamiento** (conducta expectante o “watch and wait”)

Varios estudios han mostrado que no existen cambios en la supervivencia si se demora el tratamiento hasta la progresión de la enfermedad. La progresión se define como síntomas constitucionales, enfermedad voluminosa, afectación de la función de órganos, citopenias por infiltración medular o gran esplenomegalia.

Esta actitud fue desarrollada principalmente por el grupo de Stanford y estaría indicada en pacientes con enfermedad diseminada, sin ningún factor de mal pronóstico.<sup>25</sup> Por el contrario no sería válida en pacientes con enfermedad localizada que podrían ser curados con tratamiento precoz.

### **Enfermedad localizada (estadios I-II)**

En este grupo se encuentran aproximadamente el 15-20% de los pacientes al diagnóstico. El tratamiento indicado puede ser radioterapia local, acompañada en algunos casos de quimioterapia.<sup>5,6</sup> Según un estudio realizado por Besa et al<sup>26</sup> en pacientes tratados con radioterapia con o sin quimioterapia, no existían diferencias significativas en la supervivencia global tras una mediana de seguimiento de 15 años; sí, en cambio, en la supervivencia libre de progresión que fue más favorable en los casos tratados con la combinación de ambas terapias.

### **Enfermedad avanzada**

#### *Monoterapia*

Los agentes alquilantes se han considerado clásicamente la opción terapéutica de elección. Clorambucilo con o sin prednisona y ciclofosfamida fue el tratamiento inicial en la mayor parte de las series. Es un tratamiento bien tolerado, administrado por vía oral y efectivo en al menos en el 70% o 80% de los pacientes. Con todo, las respuestas son a menudo incompletas y casi siempre transitorias. Además, el uso prolongado de alquilantes tiene como efecto secundario a largo plazo el aumento del riesgo de sufrir una segunda neoplasia.<sup>5,6,27,28</sup>

Tabla 4. Resumen del tratamiento inicial en el linfoma folicular

Estadio	Tratamiento
Estadio I	Radioterapia
Estadio II	Radioterapia $\pm$ Quimioterapia
Estadio III-IV	No-tratamiento
	Agentes alquilantes orales (clorambucilo, ciclofosfamida)
	Poliquimioterapia (CHOP, CVP)
	- $\pm$ Interferón
	- $\pm$ Radioterapia
	Fludarabina
	Fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrone o dexametasona
	Rituximab

#### *Poliquimioterapia*

Con referencia a la poliquimioterapia, la combinación de ciclofosfamida, vincristina y prednisona (CVP) consigue un mayor número de respuestas y éstas se obtienen más rápidamente que la monoterapia. Las remisiones completas pueden llegar al 70% y suelen mantenerse entre 1,5 y 3 años. No obstante, no aumenta la supervivencia con respecto a clorambucilo (mediana de supervivencia de 4 a 6 años).<sup>5,6,29</sup> En consecuencia, la elección de un u otro tratamiento dependerá de las características del paciente: síntomas, edad, estado general, y otros factores pronósticos.

Con el régimen clásico CHOP (ciclofosfamida, adriamicina, vincristina y prednisona), el porcentaje de respuestas oscila entre el 60 y el 80%, la mediana de supervivencia libre de progresión se encuentra entre 2 y 3 años y la mediana de supervivencia global entre 5 y 7 años. Los estudios que han comparado CVP y CHOP han mostrado resultados contradictorios,<sup>5,6,12,30-32</sup> por lo que no existe evidencia definitiva en cuanto a la necesidad de añadir doxorubicina al tratamiento inicial, agente que sí parece claramente indicado en la enfermedad refractaria.

Los análogos de las purinas como fludarabina, cladribina (2-CdA) y pentostanina (DFC), son nuevos agentes ampliamente utilizados. El mecanismo de acción es la inducción de apoptosis. La fludarabina es el fármaco más activo en la leucemia linfática crónica B, y la cladribina y la pentostatina son sobre todo eficaces en la tricoleucemia. En los linfomas indolentes como el LF estos fármacos también son de utilidad. Así, se han publicado algunos estudios en pacientes con linfomas indolentes previamente no tratados. El grupo francés Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) publicó una serie de 54 pacientes con LF tratados con fludarabina y obtuvo un 65% de respuestas con una mediana de supervivencia libre de progresión de 14 meses.<sup>33</sup> La combinación de fludarabina con ciclofosfamida consiguió en otro estudio un 100% de respuestas y una supervivencia global y libre de progresión a los 5 años del 66% y del 55%, respectivamente,<sup>34</sup> mientras que la combinación de fludarabina y mitoxantrone obtuvo un índice de respuestas del 94%.<sup>35</sup> Las respuestas en 10 pacientes de un estudio, tratados con fludarabina, mitoxantrone y dexametasona (FMD) fueron del 69%.<sup>36</sup> Recientemente el Grup per l'Estudi dels Limfomes de Catalunya i Balears (GELCAB) ha comunicado sus resultados preliminares con el esquema de fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrone (FCM) en el LF. Se trató de 53 pacientes, de ellos 40 han finalizado el tratamiento y 36 son evaluables, el 75% (30 pacientes) ha obtenido una RC y el 16% (8 pacientes) una RP, las respuestas moleculares alcanzan el 69% y la mediana de SLP a los 18 meses es del 90%.<sup>37, 38</sup>

### *Radioterapia*

Los linfomas indolentes son muy sensibles a la radioterapia y se puede obtener una respuesta satisfactoria en pocas sesiones. En el contexto de la enfermedad avanzada la administración de radioterapia puede tener dos objetivos. Uno, curativo, con la irradiación nodal total añadida a la quimioterapia, dos, paliativo, como complemento a la quimioterapia en afectaciones con gran masa tumoral o localizaciones en las que se requiere una reducción tumoral rápida para aliviar los síntomas que produce (afectación ósea, de órbita, o del sistema nervioso), o en aquellas zonas donde la quimioterapia no ha logrado una respuesta óptima.<sup>39</sup>

### *Bioterapia*

Por otro lado, el LF es una atractiva diana para modalidades de tratamiento que utilicen anticuerpos monoclonales (AcMo), ya que la estructura antigénica de la membrana del linfocito B tumoral es bien conocida. Inicialmente se obtuvieron AcMo no modificados de procedencia murina. Eran anticuerpos anti-idiotipo específicos para cada paciente y se administraron con éxito. Posteriormente, se han desarrollado anticuerpos quiméricos con gran afinidad por los antígenos diana, como es el caso de CD20 que se encuentra presente en la práctica totalidad de los linfocitos B tumorales. El anticuerpo quimérico anti-CD20, Rituximab, está compuesto por una región constante IgG-Kappa de origen humano y una región variable procedente de un AcMo anti-CD20 murino. Este anticuerpo tiene la capacidad de lisar los linfocitos CD20 positivos a través de la vía del complemento, mediante citotoxicidad mediada por anticuerpos, así como de inducir apoptosis.

La utilización de AcMo como terapia antitumoral es eficaz y poco tóxica.<sup>40</sup> Ya se han publicado los primeros estudios que utilizan Rituximab en monoterapia como tratamiento de primera línea en pacientes con linfomas indolentes. El porcentaje de respuestas se encontró entre el 63% y el 73%.<sup>41,42</sup> En estos estudios se ha demostrado la negativización del marcador genético BCL-2 en aproximadamente el 50% de los pacientes.

El interferón es un fármaco inmunomodulador. Se ha utilizado en combinación con quimioterapia como tratamiento de inducción y en monoterapia como tratamiento de mantenimiento de la respuesta obtenida. En ambos casos, especialmente en combinación, existen datos que sugieren una prolongación en la duración de la remisión y un aumento de la supervivencia global. No obstante, un número no despreciable de pacientes abandona el tratamiento debido a sus efectos secundarios<sup>5,6,12</sup>

Recientemente se han publicado dos trabajos con resultados opuestos. El primero es un meta-análisis que incluyó 1756 pacientes diagnosticados de LF no tratado, que recibieron interferón alfa más quimioterapia; el resultado fue una prolongación de la supervivencia libre de progresión para todo el grupo y un aumento de la supervivencia global en los pacientes que obtuvieron una

---



respuesta.<sup>43</sup> El segundo es un estudio realizado por el Southwest Oncology Group (SWOG) en 571 pacientes tratados con poliquimioterapia, más radioterapia en los casos de respuesta parcial, que se aleatorizaron a recibir o no interferón. En este trabajo no se observaron diferencias entre ambos grupos, ni en la supervivencia global ni en la supervivencia libre de progresión.<sup>44</sup>

**Tabla 5. Tratamiento inicial en el linfoma folicular en estadios III-IV**

Terapia	Nº de pacientes	Respuesta (%)	SLP (%) (años)	SG (%) (años)	Estudio (referencia)
Cb	33	70	0 (5)	60 (5)	Portlock et al <sup>27</sup>
Cb + P	132	36	41(5)	49 (5)	Kimby et al <sup>28</sup>
CVP	82	80	-	-	Unterhalt et al <sup>29</sup>
CHOP	415	-	-	50 (7)	Dana et al <sup>30</sup>
Fludarabina	54	65	50 (14 m)	-	Solal-Celigny et al <sup>12</sup>
Rituximab	50	73	70 (12 m)	-	Colombat et al <sup>42</sup>
FMD	10	69	-	-	Crawley et al <sup>36</sup>
FCM	10	90	-	-	López-Guillermo et al <sup>37</sup>

SLP: supervivencia libre de progresión, SG: supervivencia global, Cb: clorambucil; P: prednisona; CVP: ciclofosfamida, vincristina, prednisona; CHOP: ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisona. FCM: Fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrone; FMD: Fludarabina, mitoxantrone y dexametasona

#### 2.1.4.2. Tratamiento de rescate

Según han publicado Johnson et al<sup>13</sup>, aproximadamente el 65% de los pacientes (incluidos todos los estadios) recaen tras una primera respuesta. La respuesta final a diferentes tipos de tratamiento, como radioterapia, agentes alquilantes, o combinaciones de poliquimioterapia fue del 78% y la mediana de duración de la misma de 13 meses. Sólo el 28% de los pacientes obtuvo una

remisión completa. La mediana de supervivencia postratamiento fue de 4,6 años y de supervivencia libre de progresión de 1,7 años.

Las distintas modalidades de tratamiento de rescate se resumen en la tabla 6 y se describen a continuación.

### **Poliquimioterapia**

Tradicionalmente las pautas de rescate más efectivas en el LF en recaída o refractario incluyeron combinaciones de citostáticos como ifosfamida y etopósido (IMVP-16, MIME)<sup>45,46</sup> o Ara-C más cisplatino (DHAP, ESHAP)<sup>47,48</sup> Con ellas se obtienen hasta un 80% de respuestas, parciales o completas.

En el contexto de ensayos clínicos, se han investigado nuevos agentes citostáticos en pacientes diagnosticados de linfoma. Los taxanos como paclitaxel y docetaxel muestran una actividad limitada en el tratamiento de linfomas indolentes. Los inhibidores de la topoisomerasa I como topotecan, irinotecan y 9-aminocamptotecina, se asocian a un índice de respuestas aproximado del 25%. El oxaliplatino, nuevo análogo del platino, resultó eficaz en el tratamiento de algunos casos de linfoma refractario.<sup>40</sup>

### **Análogos de las purinas y anticuerpos monoclonales**

En la última década, se han introducido los análogos de las purinas, como fludarabina y cladribina, y los AcMo, sea en monoterapia o en combinación con fármacos citostáticos. Estas nuevas pautas obtienen resultados prometedores, con un índice de respuestas que va desde el 50% al 90%.<sup>49-69</sup>

En pacientes con LF previamente tratados, fludarabina y cladribina en monoterapia condujeron a un 15% de remisiones completas y un 50% de respuestas totales. La actividad de la pentostatina en esta indicación fue menor.<sup>40</sup>

En combinación con otros agentes, como es el caso del esquema FCM se consiguen hasta

---

un 91% de respuestas, 56% respuestas completas y 11% parciales, 24% de ellas moleculares.<sup>49</sup> Con el esquema FMD se alcanzan hasta un 94% de respuestas, de las que aproximadamente la mitad son completas.<sup>50</sup> Otro ejemplo de tratamiento combinado es 2-CdA más mitoxantrone que se asocia a un 70% de respuestas.<sup>54</sup>

La aplicación de anticuerpos anti-idiotipo sólo o en combinación con interferón, clorambucil o interleucina-2 permitió alcanzar un 66% de respuestas, 13% de ellas completas y la mayor parte de larga duración (4 a 10 años).<sup>57</sup>

En pacientes con linfomas indolentes previamente tratados, Rituximab en monoterapia obtuvo entre un 48% y un 57% de respuestas según las series, con mínima toxicidad.<sup>58,59</sup> Por otro lado, con intención de mejorar el número de respuestas, se han llevado a cabo estudios de tratamiento combinado con otros agentes. Administrado con quimioterapia tipo CHOP el índice de respuestas en un estudio llegó al 95% (55% de las cuáles fueron completas). El seguimiento mediano fue de 29 meses y no se alcanzó la mediana de la supervivencia, ni global ni libre de progresión. Los autores concluyeron que esta combinación representa un tratamiento seguro y eficaz, en el que se suman los beneficios terapéuticos de la quimioterapia y el AcMo sin que aumente la toxicidad.<sup>60</sup>

La combinación de Rituximab con interferón también obtiene resultados interesantes; en 64 pacientes tratados se observó un 70% de respuestas, de las cuáles el 33% fueron completas.<sup>61</sup> Otra pauta novedosa y efectiva es la combinación de Rituximab y fludarabina más mitoxantrone, con la que se observó un 95% de respuestas.<sup>62</sup> Se evidenció la negativización del marcador genético BCL-2 en aproximadamente el 50% de pacientes positivos pre-tratamiento. Recientemente, el grupo del MD Anderson ha publicado un estudio a este respecto; se trató de pacientes en recaída o con enfermedad refractaria y positivos para la traslocación t(14;18) que recibieron anti-CD20 en monoterapia o en combinación con CHOP. Es de destacar que se observó la negativización del gen BCL-2 en el 50% de casos.<sup>63</sup>

Otra manera de aumentar la eficacia del anticuerpo anti-célula B es conjugarlo con un isótopo radioactivo que destruiría el linfocito B al emitir partículas  $\beta$ . Los inconvenientes de este tratamiento son el elevado coste económico y el difícil manejo de los isótopos. Este tratamiento resultaría efectivo incluso en pacientes con una respuesta inmune deficiente. Los isótopos utilizados son el yodo-131 y el yttrium-90, con similar eficacia.<sup>64</sup> Con dosis no mieloablativas se obtienen respuestas en el 60-70% de pacientes,<sup>65-67</sup> pero si se aplican dosis mieloablativas y soporte de progenitores hematopoyéticos aumenta el porcentaje de respuestas favorables. A este respecto el grupo de Seattle ha publicado recientemente su experiencia. Veintinueve pacientes con linfoma se trataron con dosis mieloablativas de anticuerpo anti-CD20-yodo-131 y trasplante autogénico. Se obtuvieron un 86% de respuestas (79% completas). El seguimiento mediano fue de 42 meses y la supervivencia global y libre de progresión fueron del 68% y del 42%, respectivamente.<sup>68</sup> Este mismo grupo ha publicado recientemente su experiencia al combinar anti-CD20-yodo-131 con dosis altas de etopósido y ciclofosfamida en el contexto de trasplante autogénico. En dicho estudio se alcanzó un 87% de respuestas con una supervivencia global y libre de progresión a 2 años del 83% y 68%, respectivamente. Estos resultados son superiores a los de un grupo control no randomizado tratado en el mismo período de tiempo con ciclofosfamida, etopósido e irradiación corporal total.<sup>69</sup>

Otro método para aumentar la citotoxicidad del AcMo es conjugarlo con inmunotoxinas como la toxina diftérica o la cadena A de la ricina. Hasta el momento se han empleado anticuerpos anti CD19 y anti CD22, ya que se internalizan y permiten la penetración de la toxina en el citoplasma. Las respuestas con este tratamiento oscilan entre el 11% y el 30%, lo que sugiere que podrían ser utilizadas en combinación con otros tipos de tratamiento.<sup>40</sup>

### **Vacunas y terapia celular adoptiva**

El objetivo de esta terapia es activar el sistema inmune para que actúe suprimiendo el crecimiento tumoral. Se deben crear vacunas que representen antígenos tumorales reconocibles por

---

el sistema inmunológico. Los linfomas B son enfermedades interesantes a este respecto, por la accesibilidad a la célula tumoral y porque poseen moléculas diana expresadas en la superficie.<sup>70-72</sup> Estas estrategias terapéuticas son de gran interés, pero presentan dificultades prácticas que impiden su aplicación universal. Se ha de crear una vacuna para cada paciente, lo que conlleva un importante gasto económico y un gran consumo de tiempo. Su producción es difícil y ésta se limita a unos pocos centros especializados. Otro inconveniente es la presencia de clones tumorales negativos para el idiotipo contra el que se ha creado inmunidad. Además, es obligatorio para su eficacia que el paciente tenga una capacidad inmune preservada.<sup>70-72</sup>

Un proyecto llevado a cabo por Hsu y colaboradores estudió la inmunización de pacientes con linfoma cuando se hallaban en respuesta, administrando inmunoglobulinas purificadas procedentes de estos mismos pacientes. Los enfermos que desarrollaron respuesta inmune a la vacuna tuvieron una duración mayor de la respuesta alcanzada y algunos de estos pacientes además desarrollaron células T citotóxicas idiotipoespecíficas.<sup>73,74</sup> El mismo grupo ha estudiado la posibilidad de estimular células dendríticas "ex vivo" obtenidas de la sangre periférica, con un idiotipo determinado y volver a administrarlas al paciente con el fin de obtener respuestas mediadas por linfocitos T.<sup>75</sup> Finalmente, otro método para producir inmunización es utilizar las propias células tumorales como células presentadoras de antígeno. En este caso son las propias células tumorales las que se han de activar "ex vivo"<sup>76</sup>

### **Oligonucleótidos antisentido**

Los oligodeoxinucleótidos antisentido son cadenas de 15 a 30 bases de nucleótidos que al unirse específicamente al ARN mensajero inhiben la codificación de la proteína determinada por dicho ARNm. En el tratamiento de los LF se utiliza la proteína BCL-2 como molécula diana, ya que su inhibición específica sería capaz de impedir el crecimiento tumoral. En la actualidad se están llevando a cabo diversos estudios en este sentido pero no existen conclusiones definitivas.<sup>77,78</sup>

Tabla 6. Esquemas más utilizados en el tratamiento de rescate en linfomas indolentes

Terapia	Nº de pacientes	Respuesta (%)	SG (%) (meses)	SLP (%) (meses)	Estudio (referencia)
MIME	91	55	-	-	Cabanillas et al <sup>46</sup>
ESHAP	36	75	50 (24)	50 (12)	Rodríguez-Monge et al <sup>47</sup>
DHAP	35	45	50 (24)	30 (12)	Rodríguez-Monge et al <sup>47</sup>
Fludarabina	88	44	-	-	Pigaditou et al <sup>52</sup>
FMD	51	94	50 (34)	50 (14)	McLaughlin et al <sup>50</sup>
FCM	34	91	-	-	Ferrer et al <sup>49</sup>
2-Cda	40	43	-	-	Kay et al <sup>56</sup>
Rituximab	37	57	-	50 (8)	Piro et al <sup>59</sup>
Rituximab + CHOP	40	95	-	-	Czuczman et al <sup>60</sup>
Rituximab +IFN	64	70	80 (36)	50(19)	Sacchi et al <sup>61</sup>
Rituximab + FM	21	95	-	-	Recasens et al <sup>62</sup>
<sup>131</sup> I tositumomab	28	86	-	50 (12)	Kamiski et al <sup>67</sup>

SG: Supervivencia global; SLP: Supervivencia libre de progresión; MIME: Metilprednisolona, ifosfamida, metotrexato y etopósido; ESHAP: Etopósido, metilprednisolona, cisplatino y Ara-C; DHAP: Dexametasona, cisplatino y Ara-C; FMD: Fludarabina, mitoxantrone y dexametasona; FCM: Fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrone; 2-CdA: Cladribina; CHOP: Ciclofosfamida, vincristina, adriamicina y prednisona; IFN: Interferón; FM: Fludarabina y mitoxantrone.

## **2.2. Trasplante de progenitores hematopoyéticos en el linfoma folicular**

El trasplante de progenitores hematopoyéticos es el procedimiento por el que los pacientes reciben dosis altas de quimioterapia, asociadas o no a radioterapia, seguidas de la administración de células madre hemopoyéticas para restablecer la mielopoyesis deprimida tras el tratamiento. Con la intensificación en la dosis de tratamiento se pretende vencer la resistencia de la enfermedad linfoproliferativa a la quimioterapia estándar. No se deben superar aquellas dosis que produzcan una toxicidad extramedular irreversible o inaceptable. La toxicidad medular puede resolverse gracias al soporte con PH.<sup>79</sup>

En las dos últimas décadas, hemos asistido a un incremento constante del número de pacientes con LF tratados con TPH, tanto autogénico como alogénico. Diversas razones pueden explicar este hecho: los buenos resultados iniciales obtenidos en pacientes con enfermedad avanzada y la disminución de la toxicidad relacionada con el procedimiento.

La morbi-mortalidad debida al tratamiento intensivo se ha reducido gracias a los avances en el soporte de estos pacientes, a la aplicación de regímenes de acondicionamiento menos tóxicos, a la utilización de PH de sangre periférica que reduce el período de pancitopenia, a un mayor control de las infecciones, y en el caso del trasplante alogénico, a la mejora en la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped.

### **2.2.1. Obtención de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica**

Los progenitores hematopoyéticos (PH) obtenidos de la sangre periférica son en la actualidad más utilizados en el trasplante autogénico que los procedentes de la médula ósea.<sup>80</sup> Su uso también está en aumento en el trasplante alogénico, como alternativa a la obtención de PH de médula ósea de donantes sanos.<sup>81</sup> La utilización de PH de sangre periférica reduce el período de pancitopenia y podría disminuir el riesgo de infecciones, de sangrado, la utilización de hemoderivados

y antibióticos, y acortar el tiempo de ingreso hospitalario.<sup>82</sup>

En condiciones basales la presencia de PH circulantes en la sangre periférica es casi indetectable (2 por 100.000 células mononucleadas, es decir, cien en 1 ml de sangre periférica). Por ello se han diseñado métodos para obtener un número suficiente de PH de sangre periférica para su uso clínico. Esta estrategia se denomina tratamiento de movilización porque consigue "movilizar" los PH desde la médula ósea al torrente sanguíneo y aumentar su número circulante. Para conseguir un número adecuado de células, éstas deben obtenerse después tratamiento con factores estimulantes del crecimiento hematopoyético, tras quimioterapia en la fase de recuperación de la mielodepresión, o con la combinación de ambas terapias.<sup>83</sup> Los factores estimulantes del crecimiento hematopoyético aprobados para esta indicación son los factores estimulantes del crecimiento de las colonias granulocíticas (G-CSF) y de las colonias granulo-macrofágicas (GM-CSF), en dosis de 5-16 µg/kg/d. Su administración es subcutánea. Se han investigado otros factores como interleucina 3 (IL-3), stem cell factor (SCF), factor estimulante del crecimiento y desarrollo megacariocítico (MGDF) o trombopoyetina (TPO) en el contexto de estudios clínicos, bien en monoterapia, bien en combinación con G-CSF, GM-CSF, o quimioterapia.<sup>83</sup> La utilización de los factores estimulantes del crecimiento hematopoyético combinados con quimioterapia mielodepresora produce un aumento hasta de 1.000 veces de los PH circulantes durante la fase de recuperación de la aplasia.<sup>83</sup>

Por otro lado, el número de células CD34+ que se administra en el trasplante es un índice del potencial de injerto. Muchos grupos consideran una dosis de células CD34+ entre 2 y 5 x 10<sup>6</sup>/kg la óptima para una reconstitución hematopoyética rápida después de autotrasplante. Asimismo, la dosis mínima que conseguiría este objetivo sería de 1 x 10<sup>6</sup>/kg.<sup>84,85</sup> Los factores que influyen en el número de células progenitoras obtenidas son: tipo de tumor, tiempo desde el diagnóstico, estado de la enfermedad, quimioterapia previa, radioterapia previa, dosis de factor estimulante, tipo de quimioterapia movilizadora y fallo previo de movilización. La enfermedad linfoproliferativa y la fase avanzada son factores negativos. Este hecho podría explicarse por la utilización de agentes alquilantes o análogos de las purinas, modalidades de tratamiento de primera y segunda línea que

---



afectan a la hematopoyesis.<sup>86-94</sup>

Se han utilizado diversas terapias como tratamiento de movilización en pacientes diagnosticados de linfoma. Un buen esquema movilizador sería el que nos permitiera conseguir un adecuado número de células CD34+ con el menor número posible de leucoaféresis y con una toxicidad mínima para el paciente.<sup>95</sup> No existe un tratamiento estándar para inducir dicha movilización en pacientes con linfoma y que se base en estudios aleatorizados. Ciclofosfamida (en dosis de 1,5 g/m<sup>2</sup> a 3 g/m<sup>2</sup>) y factor estimulante de las colonias granulocíticas (G-CSF) es la combinación más utilizada. Otros esquemas también se aplican con igual objetivo en los pacientes con linfoma.<sup>83,95-96</sup> A este respecto, existen publicaciones sobre los resultados obtenidos con combinaciones ampliamente conocidas como tratamiento de segunda línea o rescate, tales como ESHAP, DHAP, mini-BEAM o Dexa-BEAM en combinación con factores estimulantes. Estas pautas pueden tener importante toxicidad no hematológica que haga inviable en ocasiones un trasplante posterior. Además, su toxicidad sobre la médula puede comprometer la obtención de células progenitoras.<sup>97-100</sup> Por otro lado, recientemente se ha publicado la efectividad de combinaciones de citostáticos como ciclofosfamida, etopósido, epirubicina, ifosfamida o carboplatino, con G-CSF. Algunos de estas combinaciones se utilizaron como tratamiento antitumoral a la vez que movilizador.<sup>91-93, 101-103</sup>

### 2.2.2. Tratamiento "ex vivo" de la celularidad

A pesar de administrar quimioterapia de rescate para reducir la carga tumoral, de obtener PH sin aparente contaminación tumoral, y de administrar tratamiento de acondicionamiento intenso, existe un patrón continuo de recaída postrasplante de la enfermedad. Por ello, en los linfomas indolentes no se alcanza una meseta ("plateau") estable ni en la SLP ni en la SG.<sup>104,105</sup> Esto podría deberse a la enfermedad residual del paciente. Se ha demostrado con la aplicación de técnicas sensibles de detección de células tumorales, que médulas óseas histológicamente sin infiltración están contaminadas por células linfomatosas en un 20-70% de los casos. La contaminación tumoral

también se ha evidenciado en los PH obtenidos de sangre periférica durante la movilización.<sup>106-110</sup> Si estas células tumorales que contiene el injerto contribuyen a la recaída o no, es todavía un tema controvertido, aunque con estudios de marcado de genes se ha demostrado esta hipótesis en algunos casos.<sup>111, 112</sup>

Con el objetivo de conseguir la eliminación o la reducción de células tumorales del injerto, se han ensayado diversos tipos de tratamiento de los PH. Investigadores del Dana Faber Cancer Institute (DFCI) han demostrado la eficacia del tratamiento de eliminación de células tumorales, de la médula ósea de pacientes con LF. Dicha eficacia se evaluó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los mismos autores mostraron como el tratamiento "ex vivo" de los PH mejoró la SLP.<sup>113</sup> Por el contrario, otros investigadores no han reproducido este efecto favorable.<sup>114,115</sup> Las técnicas de tratamiento "ex vivo" de los PH van desde el uso de quimioterapia<sup>116</sup> a métodos inmunológicos (utilización de AcMo). Estos últimos consiguen o bien la selección positiva de los PH que marcan característicamente el antígeno CD34,<sup>117</sup> o bien la depleción directa de células tumorales. El tratamiento "ex vivo" con AcMo puede realizarse mediante diferentes técnicas; una de las más ampliamente utilizadas es la técnica inmunomagnética, en la cual se combinan bolas que contienen polímeros de hierro, conjugadas con anticuerpos policlonales dirigidos contra antígenos tumorales. Las células tumorales se unen a estos anticuerpos y estos complejos se pueden separar al exponerlos a un campo magnético. Este método se ha utilizado en pacientes con LNH, leucemia aguda linfoblástica, mieloma múltiple, neuroblastoma y otros tumores no hematológicos.<sup>118-126</sup> El método inmunomagnético es el utilizado en gran parte de nuestros pacientes.<sup>127</sup> Otros métodos inmunológicos utilizan AcMo y complemento para destruir las células tumorales.<sup>128</sup>

Una modalidad de tratamiento "ex vivo" combinado es la llamada doble selección, también realizada mediante técnicas inmunomagnéticas. Se compone de una selección positiva de células progenitoras CD34+, y una selección negativa o depleción de células neoplásicas. Así se pueden eliminar las células tumorales que expresan el antígeno CD34. Esta técnica se ha realizado en los servicios de Hematología Clínica del HSCSP y del Hospital Clínico de Barcelona por Altés et al,<sup>129</sup> en

---

los PH obtenidos de sangre periférica de pacientes diagnosticados de síndromes linfoproliferativos crónicos como el LF. Los resultados preliminares indican que es un procedimiento eficaz, que permite la recuperación del 50% de las células CD34+, sin celularidad tumoral acompañante en el 92% de los casos.<sup>129</sup>

### **2.2.3. Trasplante autogénico de progenitores hematopoyéticos en el linfoma folicular**

El trasplante autogénico se ha utilizado ampliamente en los pacientes con LNH. Su eficacia se ha demostrado ya en hemopatías como el linfoma difuso de células grandes. En este ámbito, diversos estudios sugieren un beneficio en los pacientes con enfermedad refractaria, en recaída, o en primera remisión con factores pronósticos adversos al diagnóstico.<sup>79,130</sup> Por otro lado, los avances producidos en el tratamiento de soporte de dichos pacientes han disminuido la morbi-mortalidad relacionada con el trasplante<sup>79, 130</sup>

En los últimos años el trasplante autogénico se ha utilizado en pacientes diagnosticados de linfoma folicular. Inicialmente se llevó a cabo en los casos con enfermedad refractaria o en recaída, y posteriormente como consolidación de una primera remisión en pacientes jóvenes con factores de mal pronóstico. El objetivo del trasplante fue erradicar la enfermedad, o al menos prolongar la supervivencia con respecto al tratamiento convencional. Los resultados fueron en general favorables, con todo, debido al curso indolente de estas neoplasias, el tiempo de seguimiento breve no permite conocer el impacto real de este procedimiento sobre la SG.<sup>105, 131-146</sup>

#### **2.2.3.1. Pacientes con enfermedad en recaída o refractaria**

Se han publicado diversos trabajos que presentaron los resultados del tratamiento intensivo y soporte con PH autogénicos (bien de médula ósea o bien de sangre periférica), en pacientes con

LF en recaída o refractario. En algunos casos se efectuó tratamiento "ex vivo" de los PH. En la tabla 7 se recogen las series más importantes.

**Tabla 7. Trasplante autogénico en linfoma folicular en fase avanzada**

Estudio (referencia)	Nº de pacientes	SLP (%) (años)	SG (%) (años)
Freedman et al <sup>131</sup>			
DFCI	153	42 (8)	66 (8)
Apostolidis et al <sup>132</sup>			
St. Bartholomew's Hospital	99	63 (5)	69 (5)
Bierman et al <sup>134</sup>			
Universidad de Nebraska	100	44 (4)	65 (4)
Bastion et al <sup>135</sup>			
Centre Hospitalier Lyon Sud	60	53 (2)	86 (2)

SLP: Supervivencia libre de progresión, SG: Supervivencia global, DFCI: Dana Faber Cancer Institute

La mediana de la SLP fue aproximadamente de 4 años, y la SG a los 4 años del 60-70%.

Las características de los pacientes en cuanto a líneas de tratamiento recibidas, estado de la enfermedad al trasplante y quimiosensibilidad, variaron según las series e incluso en el mismo estudio. En cuanto a la fuente de progenitores autogénicos y su tratamiento "ex vivo", en el Dana Farber Cancer Institute<sup>131</sup> y en el St. Bartholomew's Hospital<sup>132, 133</sup> se utilizó médula ósea tratada con AcMo anti-B; en la serie del Nebraska Medical Center<sup>134</sup> los PH procedían de médula ósea o de sangre periférica pero no se trataron "ex vivo", y en el Centre Hospitalier Lyon-Sud<sup>135</sup> se utilizaron sólo PH de sangre periférica no tratados.

En un estudio de Rohatiner et al<sup>133</sup>, con pacientes del St. Bartholomew's Hospital, los

resultados de la terapia intensiva se compararon con controles históricos tratados con quimioterapia, emparejados por edad y estado de la enfermedad. Se demostró una ventaja para el grupo tratado con autotrasplante en la SLP pero no en la SG.

### 2.2.3.2. Pacientes con transformación histológica

Los pacientes con transformación histológica de su LF, tratados con trasplante autogénico presentan un alto índice de recaídas tempranas. Tan sólo se han obtenido buenos resultados en pacientes con enfermedad quimiosensible o con transformación temprana en el curso de la enfermedad. En el St. Bartholomew's Hospital se trataron 27 pacientes con antecedentes de transformación, diecinueve en primera remisión tras dicho evento y la mediana de la SG fue de 8,5 años.<sup>136</sup> En el DFCI se trasplantaron 27 pacientes, diagnosticados de LF o leucemia linfática crónica B; sólo el 44% estaban en remisión previa al trasplante, la SLP y la SG a los 5 años fueron del 46% y 58%, respectivamente.<sup>137</sup> Berlung et al<sup>138</sup> publicaron una serie de 22 pacientes con LF, de los cuáles la mitad presentaban transformación histológica y el resto tenían factores pronósticos adversos; la SLP fue del 72% y la SG del 81% sin diferencias entre los dos grupos, con un seguimiento mediano de 6 años.

Recientemente se han publicado los datos del Grupo Europeo de Trasplante Hemopoyético (EBMT) a este respecto. Se trata de un estudio de 50 pacientes diagnosticados de LF transformado. Este grupo se comparó por duplicado con 200 pacientes con linfomas indolentes y con 200 pacientes con linfoma agresivo de novo, todos ellos tratados con trasplante autogénico. La SG y la SLP a 5 años fueron de 51 y 30%, respectivamente. La comparación con los dos grupos antes descritos no mostró diferencias estadísticamente significativas.<sup>139</sup>

Estos datos apoyarían la indicación de la terapia intensiva en pacientes con historia de transformación histológica, ya que ésta se asocia a mala respuesta al tratamiento quimioterápico convencional. El trasplante autogénico en esta situación parece aumentar la supervivencia.

### 2.2.3.3. Pacientes en primera remisión

Si consideramos que el LF en estadio avanzado es una enfermedad incurable y que la mortalidad relacionada con el autotrasplante es baja, podría justificarse considerar esta terapia tras una primera respuesta en los pacientes con enfermedad avanzada y factores adicionales de mal pronóstico. El objetivo del trasplante sería alcanzar una SLP más prolongada que con el tratamiento convencional y aumentar la supervivencia. En la tabla 8 se recogen las series más importantes de autotrasplante en fase precoz. Los pacientes corresponden a estadios avanzados en primera respuesta, completa o parcial. Como fuente de progenitores hematopoyéticos se utilizó la médula ósea en los casos del DFCI y de Stanford, y la sangre periférica en el hospital de Turín. En las tres series los PH se trataron "ex vivo" con AcMo anti-B.

**Tabla 8. Trasplante autogénico en linfoma folicular en primera remisión**

Estudio (referencia)	Nº de pacientes	SLP (%) (años)	SG (%) (años)
Freedman et al <sup>140</sup>			
DFCI	83	63 (3)	89 (3)
Tarella et al <sup>141</sup>			
Divisione Universitaria di Ematologia, Turín	29	59 (9)	79 (9)
Horning et al <sup>142</sup>			
Universidad de Stanford	37	60 (10)	86 (10)

SLP: Supervivencia libre de progresión, SG: Supervivencia global DFCI: Dana Farber Cancer Institute

Los resultados en términos de SLP y SG son superiores a los esperados con terapia convencional. En el trabajo de Horning et al<sup>142</sup> los 37 pacientes se compararon con controles

históricos y se demostró una superioridad en la supervivencia en el grupo tratado con trasplante (figuras 10 y 11)

Todos estos estudios indican que el autotrasplante hemopoyético se asocia a SLP prolongada en más del 50 % de los pacientes con LF en primera remisión. La mortalidad temprana relacionada con el procedimiento es en general inferior al 5%. Ya que el tiempo de seguimiento de las series es aún corto y que se observa un patrón continuo de recidiva de la enfermedad, no se puede afirmar todavía que el trasplante autogénico en los pacientes con LF en primera remisión mejore la SG.

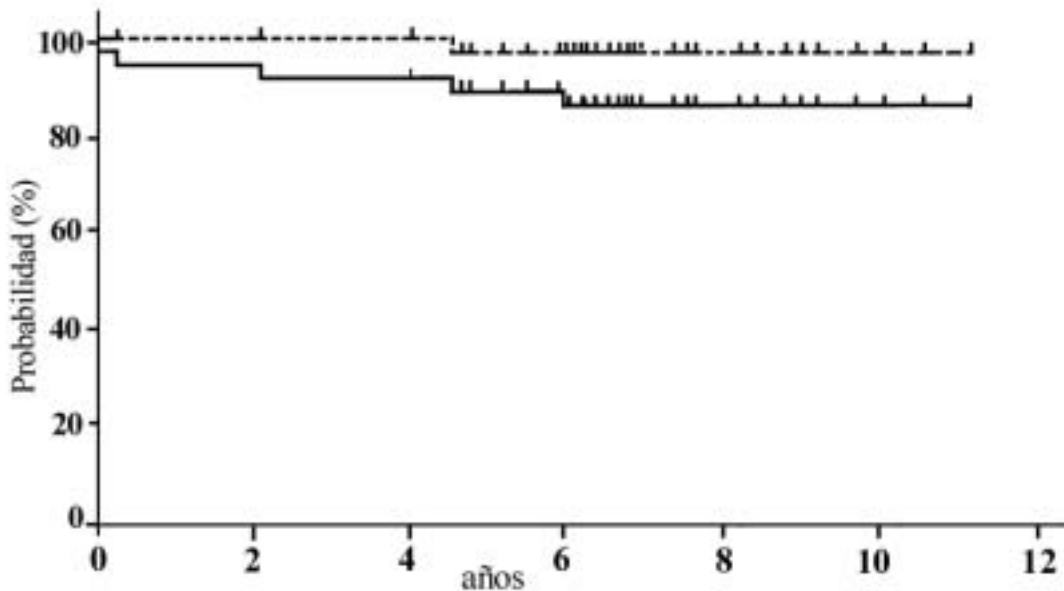


Figura 10. SG (línea continua) y supervivencia enfermedad-específica (línea discontinua) de los 37 pacientes trasplantados en el estudio de Horning et al <sup>142</sup>

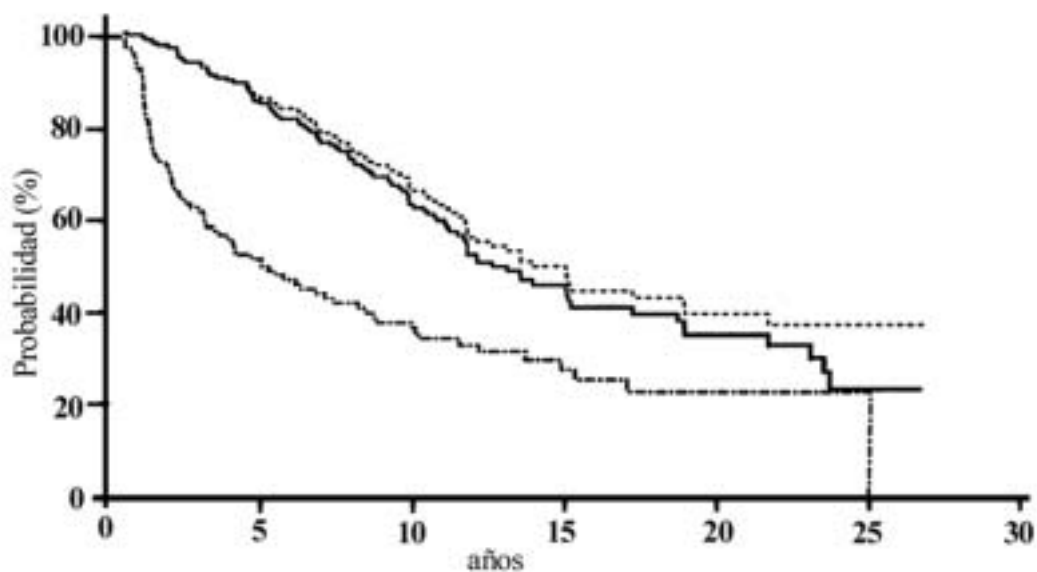


Figura 11. Supervivencia en pacientes históricos, menores de 50 años, con linfoma folicular tratados en la Universidad de Stanford. SG (línea continua, n = 188), supervivencia enfermedad-específica (línea discontinua, n = 188), SLP (línea discontinua con puntos, n = 138, se han excluido los pacientes que no se trataron inicialmente)<sup>142</sup>

Nota: En la supervivencia enfermedad-específica los fallecimientos debidos a otras causa son observaciones censuradas.

#### 2.2.3.4. Síndrome mielodisplásico y leucemia aguda postrasplante

Además de las complicaciones tempranas relacionadas con el trasplante, existe una complicación a largo plazo, la aparición de un síndrome mielodisplásico (SMD) o una leucemia aguda (LA) que está en relación con la terapia aplicada. En los primeros años de la década de los 90 se publicaron las primeras series a este respecto. En lo referente a pacientes diagnosticados de LNH y linfoma de Hodgkin, las más importantes fueron las de Nebraska, Minnesota y Boston,<sup>147-149</sup> y recientemente, las del EBMT y del St. Bartolomew's Hospital de Londres.<sup>150,151</sup> En estos trabajos, el riesgo de presentar esta complicación varió entre el 4% a los 5 años y el 18% a los 6 años, con unos



extremos en el tiempo de presentación de 5 meses a 8 años. Favorecieron su desarrollo la irradiación en el acondicionamiento, el haber recibido diversas líneas de tratamiento, particularmente si incluyeron agentes alquilantes, y un período prolongado entre el diagnóstico y el trasplante.<sup>147-152</sup> En un estudio de revisión en el que se incluyeron diversas series, se concluyó que la aparición de SMD o LA implica un pronóstico muy desfavorable. A pesar de tratarse con terapia intensiva, que incluyó trasplante alogénico en algunos casos, la mediana de supervivencia fue sólo de 6 meses y una minoría de pacientes seguían vivos a los 18 meses.<sup>152</sup>

#### **2.2.3.5. Recaída postrasplante**

Como hemos señalado previamente, existe un patrón continuo de recaída postrasplante del linfoma. El grupo de St. Bartholomew's Hospital publicó un trabajo en el que describió la evolución de los pacientes después de producirse este evento.<sup>104</sup> La SG a los 5 años tras la recidiva fue del 45%, similar a la de controles históricos que habían recibido tratamiento convencional.

#### **2.2.4. Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos en el linfoma folicular**

El trasplante alogénico se desarrolló inicialmente como tratamiento de las leucemias agudas y crónicas. Este procedimiento tiene una gran eficacia antitumoral gracias a la intensidad de la quimio-radioterapia y al efecto antineoplásico del sistema inmune del donante (efecto del injerto contra la leucemia). Otra característica beneficiosa del inóculo alogénico es la ausencia de contaminación tumoral.<sup>153,154</sup>

A principios de los años 90 se extendió la indicación del trasplante alogénico a los pacientes con linfomas indolentes y se obtuvieron remisiones prolongadas. Se trató en la mayoría de casos de pacientes jóvenes en fase avanzada.<sup>153,154</sup> El efecto injerto contra el linfoma se sustentó en las remisiones prolongadas obtenidas en pacientes en recaída postrasplante con la retirada del

tratamiento inmunosupresor o con administración de linfocitos del donante. También, en la menor incidencia de recaída en los pacientes que presentaban enfermedad del injerto contra el huésped crónica,<sup>155,156</sup> y en la menor tasa de recidivas tras el trasplante alogénico que tras el autogénico en varios estudios<sup>157-166</sup>. Este efecto favorable del trasplante alogénico se contrarresta en parte por la elevada mortalidad relacionada con el procedimiento (tabla 9).

En 1998 se publicaron los resultados del Registro Internacional de Trasplante Médula Ósea (IBMTR) en 113 pacientes con linfomas indolentes (en su mayoría LF). La probabilidad de recidiva y la probabilidad de supervivencia libre de enfermedad a 3 años fueron del 16 y 49%, respectivamente. La mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) fue del 28%.<sup>157</sup> Series más pequeñas, como la publicada por van Besien con diez pacientes tratados en M.D. Anderson Cancer Center (MDACC), mostraban ausencia de recaídas, una SLP del 80% a 3 años y una mortalidad del 20%.<sup>164</sup>

En cuanto a trabajos comparativos entre el trasplante autogénico y el trasplante alogénico, en 1997 se comunicaron los resultados del EBMT en pacientes con diferentes tipos de linfoma. Respecto a los linfomas indolentes, 113 receptores de trasplante alogénico presentaron una SG y una SLP a 4 años del 50% y del 42%, respectivamente; la mortalidad relacionada fue del 38%. Estos datos fueron comparados con el autotrasplante concluyendo que el trasplante alogénico presentaba menor probabilidad de recaída ( $P=0.0005$ ) aunque la SG fue mayor con autotrasplante ( $P<0.001$ ).<sup>158</sup> Attal et al<sup>159</sup> publicaron los resultados del Grupo Francés de Trasplante (FBMTG), en 72 trasplantes alogénicos y 144 autogénicos. El trasplante alogénico frente al autogénico se asoció a menor probabilidad de recaída (12% frente al 55%,  $P<0.001$ ) y supervivencia libre de enfermedad a los 4 años similar (53% frente al 45%). La MRT fue de nuevo mayor en el caso del trasplante alogénico (30% frente al 4%,  $P<0.001$ ).

Verdonck et al<sup>160</sup> publicaron inicialmente su experiencia en 1997, y han actualizado sus datos recientemente. Este grupo realizó 15 trasplantes alogénicos y 18 autogénicos, con una mortalidad relacionada del 27% frente al 0%, respectivamente. La probabilidad de recidiva y la SLP a 3 años fueron del 0% versus el 78% ( $P=0.0002$ ), y del 70% versus el 22% ( $P=0.015$ ),

---

respectivamente.<sup>161</sup> Otra experiencia reciente es la del MDACC en un estudio prospectivo que incluyó 14 trasplantes alogénicos y 72 autogénicos; la SLP a 5 años fue del 55% frente al 22% y la mortalidad relacionada del 25% frente al 7%, respectivamente.<sup>154</sup>

Estos datos sugieren que el trasplante alogénico puede ser curativo en pacientes con enfermedad avanzada, pero con algunos problemas importantes: la elevada mortalidad relacionada con el procedimiento, especialmente en una enfermedad en la mayoría de casos con larga supervivencia, y la existencia de recidivas de la enfermedad en una proporción de pacientes, a pesar del efecto del injerto contra linfoma.

**Tabla 9. Trasplante alogénico en linfomas indolentes, incluye estudios comparativos con autotrasplante**

Estudio (referencia)	Tipo de trasplante	Nº de pacientes	Recaída (%) (años)	SLP (%) (años)	MRT (%)
Van Besien et al <sup>157</sup>	Alo	113	16 (3)	49 (3)	28
IBMTR					
Peniket et al <sup>158</sup>	Alo	113	ND	42 (4)	38
EBMT					
Attal et al <sup>159</sup>	Alo	72	12 (5)	53 (4)	30
FBMTGR	Auto	144	55 (5)	45 (4)	4
Verdonck et al <sup>161</sup>	Alo	15	0 (3)	70 (3)	27
Utrecht	Auto	18	78 (3)	22 (3)	0
Champlin et al <sup>154</sup>	Alo	14	ND	55 (5)	25
MDACC	Auto	72	ND	22 (5)	7

SLP: Supervivencia libre de progresión, MRT: mortalidad relacionada con el trasplante, IBMTR: International Bone Marrow Transplant Registry, EBMT: European Bone Marrow Transplant, FBMTGR: French Bone Marrow Transplant Group Registry, MDACC: M.D. Anderson Cancer Center, ND: datos no disponibles.

En un intento de reducir la toxicidad del trasplante alogénico se han aplicado nuevas estrategias como la utilización de progenitores de sangre periférica, que consiguen un prendimiento más rápido del injerto.<sup>167</sup> También en la aplicación de acondicionamientos de intensidad reducida con administración posterior o no de linfocitos del donante<sup>168</sup> y en la depleción de linfocitos T del injerto para disminuir la enfermedad del injerto contra huésped grave.<sup>169,170</sup> Con estas estrategias se pretende disminuir la MRT, e incluso que este tratamiento sea aplicable a pacientes de edad avanzada.

### **Trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida**

La utilización de acondicionamientos de intensidad reducida es una alternativa que reduce la MRT y permite aumentar la edad de los pacientes tratados con trasplante alogénico. Este tipo de acondicionamiento no va dirigido a erradicar la enfermedad sino a conseguir una inmunodepresión suficiente que permita el injerto de células alogénicas y el desarrollo del efecto inmune injerto contra linfoma. En la actualidad se han tratado más de 600 pacientes, 18% de los cuales son LNH. En el período postrasplante si se evidencia enfermedad residual o quimerismo mixto se realiza infusión de linfocitos del donante para provocar el efecto del injerto contra linfoma. Con este procedimiento la MRT oscila según los estudios entre el 6% y el 40%, en su mayor parte asociada al desarrollo de enfermedad del injerto contra el huésped grado III-IV, principalmente en pacientes mayores de 50 años. La SLP se encuentra entre el 84% a los 21 meses y el 40% a los 37 meses según diferentes estudios.<sup>168</sup>

Con los datos actuales no se puede dar una respuesta definitiva sobre cuál es el procedimiento más adecuado en cada paciente. En general, la mayor parte de grupos recomiendan el trasplante alogénico en lugar del trasplante autogénico en pacientes jóvenes con enfermedad resistente o en recaída avanzada y con un donante HLA-compatible.

---

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **Hipótesis**

El LF es una neoplasia linfoide diferenciada incurable con tratamiento quimio-radioterápico convencional. A pesar de la alta frecuencia de respuestas obtenidas con el primer tratamiento la mayoría de pacientes recaen. En la actualidad existe una evidencia clara que la calidad de las respuestas obtenidas puede tener impacto sobre la supervivencia global. Un régimen de quimioterapia de rescate intensiva, tal como IAP-VP16, podría asociarse a una proporción elevada de respuestas en pacientes con LF refractario o en recaída, el mismo régimen podría ser útil para movilizar y recoger progenitores hematopoyéticos de sangre periférica y para llegar a la fase de trasplante autogénico con mínima carga tumoral.

## **Objetivos**

Los objetivos de la presente tesis son:

1. El estudio de la eficacia antitumoral y la toxicidad del esquema poliquimioterápico original IAPVP-16 en los pacientes con LF refractario, en respuesta parcial o en recaída.
2. El análisis de la capacidad movilizadora de progenitores hematopoyéticos a sangre periférica del esquema de tratamiento IAPVP-16 más G-CSF, en pacientes con neoplasias linfoides en fase refractaria o en recaída.
3. El estudio de la eficacia antitumoral y la toxicidad del trasplante autogénico en pacientes con LF en fase avanzada, en su mayoría previamente tratados con el esquema IAPVP-16.

#### **IV. PACIENTES Y METODOS**





#### 4.1. Población estudiada

- Cuarenta y cuatro pacientes adultos diagnosticados de LF refractario, en respuesta parcial o en recaída, tratados con el esquema poliquimioterápico IAPVP-16 como tratamiento antitumoral entre octubre de 1990 y enero de 1998.
- Cuarenta y cinco pacientes adultos diagnosticados de neoplasia linfoide (dieciséis casos de LF) en fase refractaria o en recaída, tratados con el esquema IAPVP-16 más G-CSF, como terapia movilizadora de progenitores hematopoyéticos a la sangre periférica, entre febrero de 1991 y marzo de 1997.
- Treinta pacientes adultos diagnosticados de LF en fase avanzada, tratados con trasplante autogénico entre septiembre de 1990 y octubre de 1997. Veintitrés de ellos habían recibido previamente el esquema IAPVP-16.

#### 4.2. Aspectos analizados

- Eficacia antitumoral del esquema IAPVP-16 en términos de tipo y duración de la respuesta, supervivencia global y supervivencia libre de progresión.
- Toxicidad relacionada con la quimioterapia IAPVP-16.
- Capacidad movilizadora de progenitores hematopoyéticos a la sangre periférica del tratamiento IAPVP-16 más G-CSF en términos de obtención de una cifra óptima ( $>5 \times 10^6/\text{kg}$ ) y de una cifra adecuada ( $>2 \times 10^6/\text{kg}$ ) de células CD34+.
- Identificación de las variables predictivas del éxito o fracaso de la movilización.
- Relación entre la cifra de células CD34+ en la sangre periférica y la cifra de células CD34+ y de CFU-GM en el producto de la leucoaféresis del mismo día.
- Eficacia del trasplante autogénico en términos de tipo y duración de la respuesta, supervivencia global y supervivencia libre de progresión.
- Toxicidad relacionada con el trasplante autogénico.

## V. RESULTADOS



---

## 5.1. Manuscrito número 1:

### Tratamiento de rescate con quimioterapia tipo IAPVP-16 en pacientes con linfoma folicular refractario o en recaída

#### 5.1.1. Resumen

Los pacientes con linfoma folicular que no responde al tratamiento de primera línea, o aquéllos que recaen después de obtener una respuesta, presentan una disminución en sus expectativas de supervivencia. En un intento por obtener un alto porcentaje de respuestas en 1991 diseñamos una pauta de poliquimioterapia de rescate intenso pero de breve duración: el esquema IAPVP-16 que incluye:

- ifosfamida 5 g/m<sup>2</sup>, administración ev de 2 horas, día 1.
- etopósido (VP-16), 100 mg/m<sup>2</sup>, administración ev de 1 hora, días 1 a 3.
- Ara-C, 1,2 g/m<sup>2</sup> cada 12 horas, administración ev de 2 horas, días 1 y 2.
- metilprenisolona, 80 mg/m<sup>2</sup> ev, días 1 a 5.

Se utilizó factor estimulante de las colonias granulocíticas (G-CSF) desde el día 6 del tratamiento, hasta la recuperación neutrofilica, en 68 de 114 ciclos. Los ciclos se repitieron cada 28-35 días. La mediana de ciclos administrados por paciente fue de 2 (extremos 1-6).

Se trataron 44 pacientes con linfoma folicular en fase avanzada: 9 con enfermedad primariamente refractaria, 13 en remisión parcial, 16 en recaída no tratada o en progresión y 6 en recaída sensible. Las características de los pacientes se muestran en la tabla 10.

Los principales parámetros analizados fueron:

1. Respuesta antitumoral en términos de respuesta completa, parcial, o no-respuesta.
2. Toxicidad relacionada con el tratamiento.

Tabla 10. Características de los pacientes

Características	Nº (%)
Total de pacientes	44
Hombres/Mujeres	24/20
Edad mediana (extremos)	49 años (29-70)
Histología	
Folicular, nodular	36 (82)
Folicular, difuso	6 (14)
Folicular, transformado a LDCL	2 (4)
Estadio	
III	10 (23)
IV	34 (77)
Quimiosensibilidad	
Primera RP	13 (30)
Recaída no tratada	16 (36)
Recaída sensible (<RP)	6 (14)
Enfermedad resistente	9 (20)
Número de afectaciones extranodales	
1	12 (27)
2	3 (7)
LDH	
Normal	37 (84)
Elevada	7 (16)
Beta-2-microglobulina	
Normal	19 (43)
Elevada	4 (9)
Desconocida	21 (48)
Masa tumoral > 10 cm	5 (11)
ECOG	
0-1	37 (84)
2	7 (16)
Índice Pronóstico Internacional	
Bajo	30 (68)
Intermedio-bajo	7 (16)
Intermedio-alto	5 (11)
Alto	2 (4)
Mediana de líneas de tratamiento previas (extremos)	1(1-4)
RT previa	2 (0)
Tiempo mediano desde el diagnóstico al inicio del tratamiento (extremos)	18 meses (2-133)

LDCL: linfoma difuso de células grandes. RP: respuesta parcial. RT: radioterapia.

3. Supervivencia libre de progresión (SLP) definida como el tiempo transcurrido desde el primer día de tratamiento hasta la recaída o la progresión de la enfermedad, el fallecimiento o el último seguimiento.
4. Supervivencia global (SG) definida como el tiempo transcurrido desde el primer día de tratamiento hasta el fallecimiento o el último seguimiento.

La SLP y la SG se calcularon según el método de Kaplan-Meier, y la prueba log-rank se utilizó para establecer diferencias en estos parámetros para diferentes variables. El test exacto de Fisher se utilizó para comparar proporciones de respuesta según diferentes variables, y la prueba t de Student para la comparación de medias.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

#### *Respuesta antitumoral*

- Remisión completa en 18 pacientes, 41%.
- Remisión parcial en 17 pacientes, 39%.
- Respuestas totales 35, 80%.
- No-respuesta 9, 20%.

Las variables analizadas como posibles factores predictivos de respuesta (RC+RP) fueron: sexo, edad, quimiosensibilidad, índice pronóstico internacional (IPI), tiempo desde el diagnóstico hasta el inicio del tratamiento con IAPVP-16 y número de líneas de tratamiento recibidas previamente. La proporción de respuestas según estos parámetros se muestra en la tabla 11.

Como puede verse en la tabla 11, sólo el IPI (bajo/ intermedio-bajo frente a alto/ intermedio-alto) se asoció de forma significativa a una mayor proporción de respuestas (86% frente al 43%, respectivamente,  $P < 0,02$ ).



Tabla 11. Características de los pacientes y respuesta

Características	Nº de pacientes	% RC + RP	P
Total de pacientes	44	80	-
Edad			
< 50 años	24	83	NS
≥ 50 años	20	75	
Sexo			
Hombres	24	75	NS
Mujeres	20	85	
Quimiosensibilidad			
Sí*	19	89	NS
No**	25	72	
Índice Pronóstico Internacional			
Bajo/ intermedio-bajo	37	86	0.024
Alto/ intermedio-bajo	7	43	
Tiempo desde el diagnóstico			
< 18 meses	23	87	NS
≥18 meses	21	71	
Nº de terapias previas			
1	30	87	NS
>1	14	64	

\*Primera RP + recaída sensible. \*\*Recaída no tratada + enfermedad resistente

Toxicidad relacionada con el tratamiento:

- Mortalidad 0%.
- Neutropenia grave en todos los ciclos. Fiebre neutropénica en el 56% de los ciclos, con sólo 4 casos de infección grave.
- Trombopenia severa el 66% de los ciclos, sin episodios hemorrágicos graves.
- Toxicidad no hematológica fue leve o moderada.

Supervivencia libre de progresión y supervivencia global:

Con un seguimiento mediano de 25 meses (extremos 4-95), las medianas de SLP y SG fueron de 32 y 58 meses, respectivamente (figura 12). Del total de pacientes, 28 se trataron posteriormente con terapia intensiva y trasplante de progenitores hematopoyéticos.

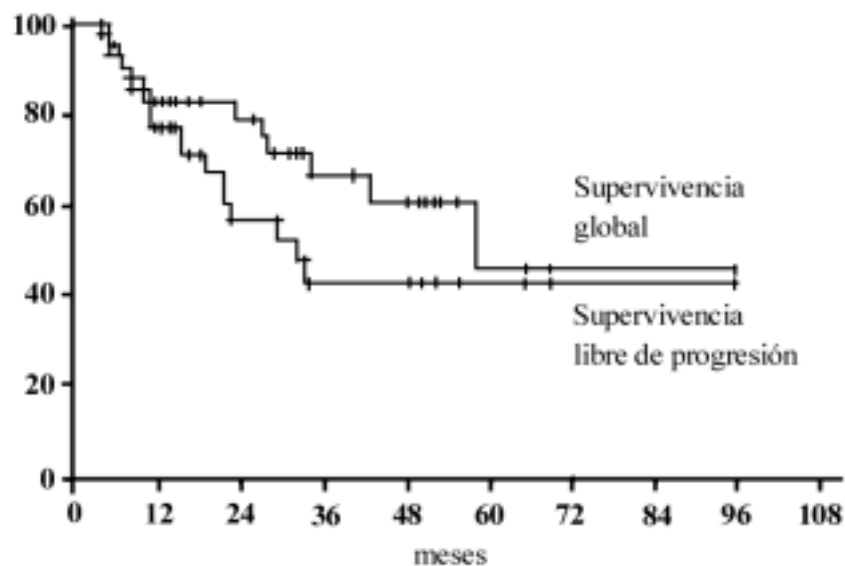


Figura 12. Supervivencia libre de progresión y global de todo el grupo

La comparación de la SLP y la SG entre los pacientes que respondieron y que no respondieron al tratamiento con IAPVP-16 (hubieran o no recibido TPH), muestra diferencias estadísticamente significativas; así, la mediana de SLP fue de 33 meses en los que respondieron vs 11 meses en los que no respondieron ( $P=0,05$ ). Del mismo modo, la mediana de la supervivencia global no se alcanzó en los que presentaron respuesta y fue de 23 meses en los que no respondieron ( $P=0,0005$ ). De los 35 pacientes que respondieron, 14 no recibieron TPH, con una mediana de SLP y de SG de 32 y 43 meses, respectivamente, mientras que no se ha alcanzado la mediana en los 21 pacientes que respondieron y recibieron un trasplante,  $P=0,44$  y  $P=0,02$ , respectivamente, (figuras 13 y 14).

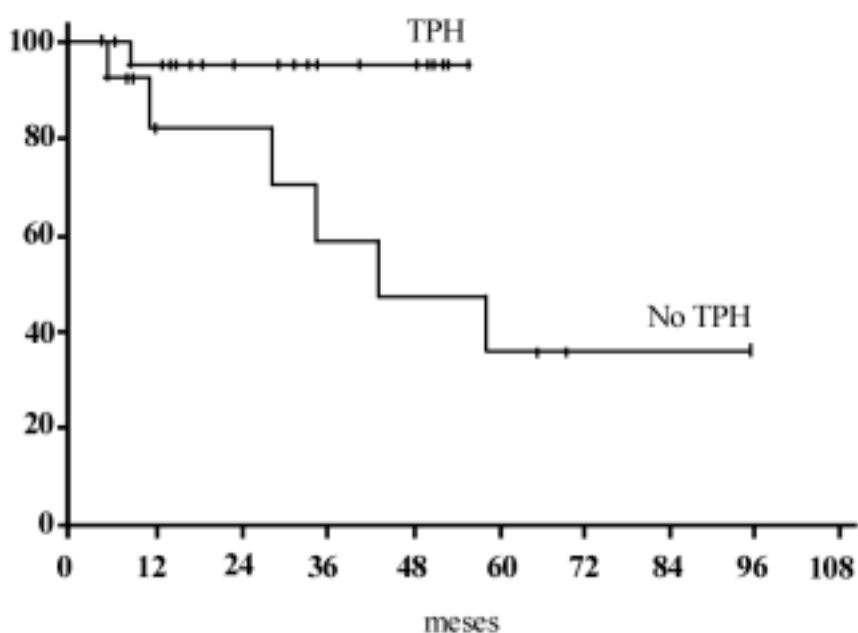


Figura 13. Supervivencia libre de progresión en los pacientes que respondieron

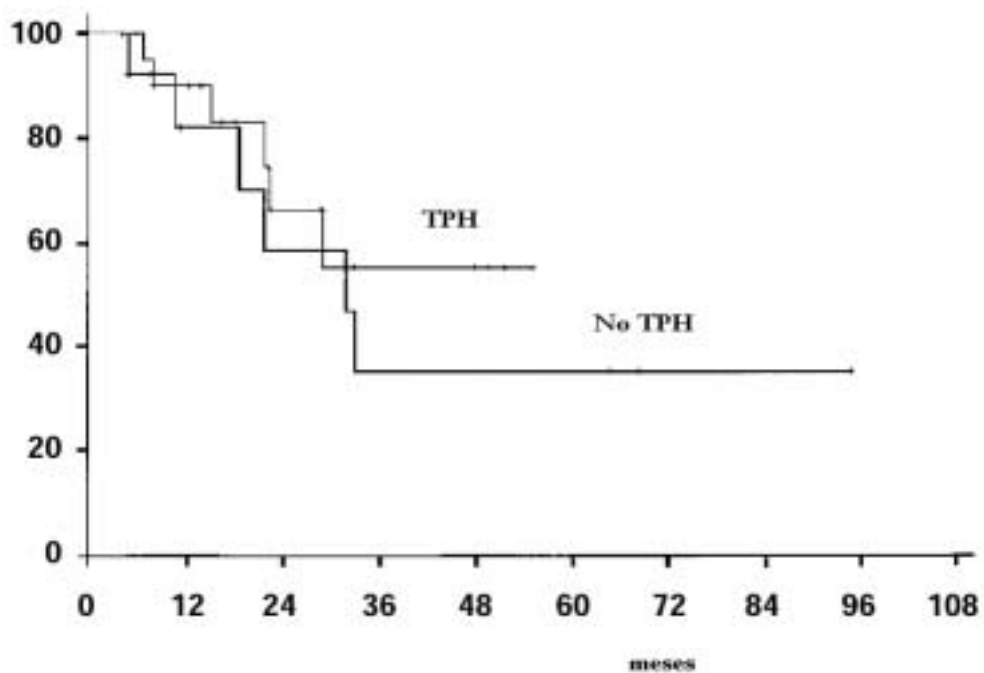


Figura 14. Supervivencia global en los pacientes que respondieron

En conclusión, el esquema poliquimioterápico IAPVP-16 se mostró eficaz y fue bien tolerado en 44 pacientes con linfoma folicular en fase avanzada. Se obtuvo un 80 % de respuestas, de las que el 41% fueron completas. La mortalidad relacionada con el tratamiento fue nula, lo que permitió en muchos casos realizar un trasplante de progenitores hematopoyéticos en situación de enfermedad mínima.

La respuesta favorable a la quimioterapia IAPVP-16 se asoció a una prolongación de la supervivencia.



## Salvage chemotherapy with IAPVP-16 for advanced refractory or relapsed follicular lymphomas

ROSARIO LÓPEZ, RODRIGO MARTINO, SALUT BRUNET, ANNA SUREDA, ANDREU DOMINGO-ALBÓS,<sup>†</sup> JORGE SIERRA

Clinical Hematology Division, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>†</sup>Deceased

### ABSTRACT

**Background and Objectives.** Patients with follicular lymphoma (FL) who do not respond to first-line chemotherapy or those who relapse after obtaining a remission have a poor outcome with standard treatment. In an effort to obtain a high rate of responses we designed an intensive brief duration salvage chemotherapy regimen.

**Design and Methods.** Forty-four consecutive patients with advanced follicular lymphoma were treated. Nine had primary refractory disease, 13 had achieved a partial remission, 16 were in untreated relapse or progression and six were in chemosensitive relapse. The IAPVP-16 regimen consists in ifosfamide 5 g/m<sup>2</sup> iv on day 1, etoposide 100 mg/m<sup>2</sup> iv on days 1-3, Ara-C 1.2 g/m<sup>2</sup>/12 hours iv on days 1-2 and methylprednisolone, 80 mg/m<sup>2</sup> iv on days 1-5. Granulocyte colony-stimulating factor was used from day 6 in 68 of 114 courses.

**Results.** Eighteen patients (41%) achieved a complete remission and 17 (39%) a partial remission, for an overall response rate of 80%. There were no treatment-related deaths. All treatment courses were followed by severe neutropenia, and 66% also by severe thrombocytopenia, but there were no serious hemorrhagic events. Neutropenic fever occurred in 56% of the courses with only four severe infections. Non-hematologic toxicity was modest. Twenty-eight patients proceeded to a stem cell transplantation. After a median follow-up of 25 months (range 4-95), the median progression-free survival and overall survival are 32 and 58 months, respectively. The median PFS was 33 months for responders and 11 months for non-responders ( $p=0.05$ ), while the median OS has not been reached in responders and is 23 months in non-responders ( $p=0.0005$ ).

**Interpretation and Conclusions.** The IAPVP-16 regimen is an effective and well tolerated treatment for advanced FL, allowing most eligible patients to proceed with significant tumor reduction to high-dose therapy and SCT.

©1999, Ferrata Storti Foundation

Key words: salvage chemotherapy, follicular lymphomas, IAPVP-16

Correspondence: R. López, M.D., Servei d'Hematologia Clínica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Av. Sant Antoni Maria Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain.  
Phone: international +34-93-2919396 - Fax: international + 34-932919466 - E-mail:28429rls@comb.es

Most patients with advanced follicular lymphoma (FL) are initially sensitive to first-line combination chemotherapy regimens, usually including an alkylating agent with or without an anthracycline. Patients who do not respond to front-line therapy or those who relapse following a first or subsequent remission have a relatively poor short-term prognosis with standard chemotherapy (CT).<sup>1-3</sup> Various salvage CT regimens have been studied in an effort to induce sustained remissions in such cases. The most effective traditional salvage protocols include combinations of ifosfamide plus etoposide<sup>4,5</sup> or Ara-C plus cisplatin,<sup>6,7</sup> although more novel approaches with purine analogs or monoclonal-antibody based therapies are yielding promising results.<sup>8-15</sup>

We report the results of an intensive brief duration salvage regimen including ifosfamide, etoposide and high-dose Ara-C (IAPVP-16) for patients with refractory or relapsed FL.

### Design and Methods

#### Patients

Patients with advanced FL defined according to the REAL classification<sup>16</sup> were eligible for treatment, with central histology review for referred patients. Histologic samples of cases treated before 1995 were reviewed to confirm the diagnosis of FL according to the REAL classification. Eight additional patients with mantle-cell lymphoma and four with small lymphocytic lymphoma were treated with IAPVP-16, but these cases are not included in this report.

Patients had to be refractory to a first-line anthracycline-containing combination CT (CHOP) or have relapsed or progressed after obtaining a remission. Eligible patients had to be between 18 and 70 years of age and have adequate organ function to tolerate intensive CT.

Forty-four consecutive patients were treated between October 1990 and January 1998. Patient characteristics are shown in Table 1. There were 24 men and 20 women, with a median age of 49 years (range 29-70). The median time from initial diagnosis to treatment was 18 months (range 2-133), and the median number of prior CT regimens was one

**Table 1. Patient characteristics.**

Characteristics	No.
All patients	44
Male/Female	24/20
Median age (range)	49 yrs. (29-70)
Histology	
Follicular, nodular	36
Follicular, diffuse	6
Follicular, transformed to DLCL	2
Stage	
III	10
IV	34
Chemosensitivity	
First PR	13
Untreated relapse	16
Sensitive relapse (<PR)	6
Resistant disease	9
Number of extranodal sites	
1	12
2	3
LDH	
Normal	37
High	7
Beta-2-microglobulin	
Normal	19
High	4
Unknown	21
Tumor mass > 10 cm	5
ECOG	
0-1	37
2	7
International Prognostic Index	
Low	30
Low-intermediate	7
High-intermediate	5
High	2
Median number of prior CT regimens (range)	1 (1-4)
Prior XRT	2
Median time from diagnosis to treatment (range)	18 mo. (2-133)

DLCL: Diffuse large cell lymphoma. PR: partial response. CT: chemotherapy. XRT: radiotherapy.

(range 1-4). Nine patients had primary refractory disease, 13 had achieved a partial remission, 16 were in untreated relapse or progression after an initial complete or partial remission and six were in chemosensitive relapse but their response had not reached a partial remission. Thirty patients had a low (0-1) international prognostic index (IPI) before IAPVP-16, and two cases had histologic signs of transformation to large-cell lymphoma.

#### Treatment schedule

The IAPVP-16 regimen consists in ifosfamide, 5 g/m<sup>2</sup> as a 2-hour intravenous (iv) infusion on day 1, etoposide (VP-16), 100 mg/m<sup>2</sup> iv over 1 hour on days 1, 2 and 3, Ara-C, 1.2 g/m<sup>2</sup> every 12 hours iv over 2 hours on days 1 and 2 and methylprednisolone, 80 mg/m<sup>2</sup> iv on days 1 to 5. Granulocyte colony-stimu-

lating factor (G-CSF) was used from day 6 until neutrophil recovery in 68 of 114 courses. Supportive care consisted in antiemetics, allopurinol, acyclovir, and most patients received antibacterial prophylaxis. Treatment cycles were repeated at 28 to 35-day intervals. Treatment-related toxicity was graded according to the World Health Organization criteria.

Since all patients with relapsed or refractory FL will ultimately progress and die of their disease irrespective of the response to salvage therapy, from 1992 onward the protocol was amended so that all patients under the age of 55 years were to proceed to an autologous or allogeneic stem cell transplant (SCT) following IAPVP-16. Chemosensitive patients were candidates for autologous SCT, while for patients not reaching a partial response, allogeneic SCT was preferred if a sibling donor was available.

#### Response criteria

Before and after treatment disease response was assessed clinically and by standard radiologic and histologic methods. Complete remission (CR) was defined as no measurable disease including no bone marrow (BM) involvement by conventional cytology and histology. Partial response (PR) consisted of at least a 50% reduction in the sum of the products of perpendicular diameters of all measurable lesions before treatment, with BM involvement of less than 20%. Response less than a PR was considered as no response (NR), and progressive disease (PD) reflected involvement of new sites after treatment, recurrence in originally involved sites, increase by more than 25% in original tumor masses and/or reappearance of BM involvement.

#### Statistical considerations

The main parameters analyzed were treatment-related toxicity, disease response, progression-free survival (PFS), defined as the interval from the first day of treatment until relapse, disease progression, death or last follow-up, and overall survival (OS), defined as the interval from the first day of treatment until death or last follow-up. Since SCT was the planned therapy for most patients in our protocol, follow-up was not censored at transplant. The closing date for analysis was June 15, 1998. PFS and OS were calculated by the Kaplan-Meier method, and the log-rank test was used to establish differences in these parameters for different variables. Fisher's exact test was used to compare proportions such as response rates according to various parameters, and the Student's t-test was used to compare means.

## Results

#### Toxicity

Forty-four patients received a total of 114 courses of IAPVP-16, with a median of two courses per patient (range 1-6). There were no treatment-related deaths. All treatment courses were followed by severe

neutropenia (neutrophils  $< 0.5 \times 10^9/L$ ), and 66% also by severe thrombocytopenia (platelets  $< 20 \times 10^9/L$ ). The mean duration of neutropenia was 5 days (range 2-10) in patients treated with G-CSF and 9 days (range 5-13) in those not ( $p < 0.001$ ). The mean duration of severe thrombocytopenia was 4 days (range 1-13), and there were no serious hemorrhagic events. Neutropenic fever occurred in 64 cycles (56%). Most ( $n=43$ ) were fevers of unknown origin, with eight uncomplicated bacteremias, nine minor respiratory or mucocutaneous infections and four severe infections (two Gram-negative septic shocks and two pneumonias of unknown cause). Non-hematologic toxicity was modest, and only three courses were complicated by grade 3-4 hepatic toxicity. Mild nausea and vomiting occurred in 62% of the patients, and 15% developed grade 1 neurotoxicity, usually manifested as somnolence immediately after the infusion of ifosfamide.

### Response and outcome

Eighteen patients (41%) achieved CR and 17 (39%) PR following IAPVP-16, for an overall response rate of 80% (95% CI, 67-92). Response rates according to various patient features are shown in Table 2. Of nine primary resistant patients, four achieved a CR and two a PR. The maximal response occurred in all patients after two or three cycles of IAPVP-16. Seven patients received one to three further courses (total four to six) since they were not eligible to receive a SCT. Variables analyzed for their predictive value for achieving a response (CR+PR) to IAPVP-16 were age, sex, proven chemosensitivity, IPI, time from diagno-

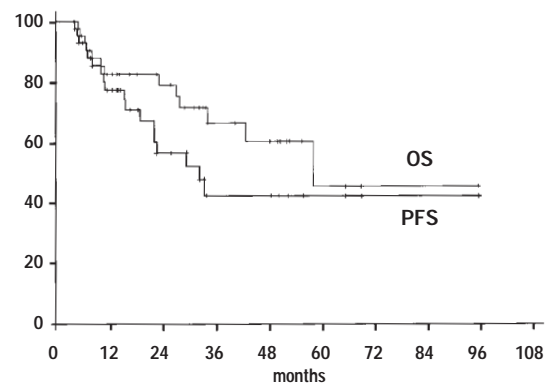
sis to IAPVP-16 and number of prior CT regimens. As shown in Table 2, only the IPI (low/low-intermediate vs high-intermediate high) was associated with the chance of obtaining a response (86% vs 43%, respectively,  $p = 0.02$ ). Twenty-eight patients proceeded to a SCT at a median time of 4 months (range 1-7) from treatment.<sup>17</sup> Ten of these patients were in CR, 11 in PR and seven had not responded to IAPVP-16. Twenty-three patients received an autologous SCT. Four received a bone marrow transplant and nineteen a peripheral blood stem cell transplant; two bone marrow transplants and six peripheral blood stem cell transplants were purged by an immunomagnetic method using anti-B antibodies, and five patients received an allogeneic SCT. Early transplant-related mortality occurred in one autologous and two allogeneic SCT recipients, and five responder patients have relapsed after an autograft.

The PFS and OS curves are shown in Figure 1. After a median follow-up of 25 months (range 4-95), 10/35 responders have progressed (five after SCT). The median PFS and OS are 32 and 58 months, respectively, and the estimated 3-year PFS and OS are 43% (95% CI, 24-62) and 66% (95%CI, 49-84), respectively, for all patients (Figure 1). Although these intervals were certainly influenced by the SCT that most patients received after salvage therapy with IAPVP-16, comparison of the PFS and OS between responders and non-responders showed significant differences. The median PFS was 33 months for responders and 11 months for non-responders ( $p = 0.05$ ), while the median OS has not been reached in responders and is 23 months in non-responders ( $p = 0.0005$ ). Overall, nine patients have died from progressive lymphoma at 6-58 months (median 27 months) from the start of IAPVP-16. Of the 35 responders, 14 did not proceed to SCT and their median PFS and OS were 32 and 43 months, respec-

**Table 2. Patient features and response.**

Feature	N <sup>a</sup> of patients	% CR + PR	p
All patients	44	80	-
Age			
< 50 years	24	83	NS
≥ 50 years	20	75	
Sex			
Male	24	75	NS
Female	20	85	
Proven chemosensitivity			
Yes*	19	89	NS
No <sup>o</sup>	25	72	
International Prognostic Index			
Low/low-intermediate	37	86	0.024
High/high-intermediate	7	43	
Time from diagnosis			
< 18 months	23	87	NS
≥ 18 months	21	71	
N <sup>o</sup> of prior CT regimens			
1	30	87	NS
>1	14	64	

CT: chemotherapy. \*First PR + sensitive relapse; <sup>o</sup>untreated relapse + resistant disease.



**Figure 1. Overall survival and progression-free survival from start of IAPVP-16 for all 44 patients.**

tively, while these intervals have not been reached in the 21 responders who were transplanted ( $p=0.44$  and  $p = 0.02$  for PFS and OS between transplanted and non-transplanted responders) (Figures 2 and 3).

**Discussion**

Follicular lymphomas is the most frequent of the low-grade or indolent non-Hodgkin's lymphomas. Despite initial response to first line therapy with an alkylating agent and/or an anthracycline-containing combination regimen in most advanced cases, disease progression will eventually occur. With the classic CHOP (cyclophosphamide, adriamycin, vincristine and prednisone) regimen, the response rate (CR + PR) ranges from 70-80%, but the median progression-free survival from remission is only two to three years and the median overall survival from five to seven years. Following a first progression, patients treated with conventional single-agent or combination

regimens have an overall median survival of 4.5 years and a median failure-free survival of 1.7 years.<sup>3</sup> However, advanced disease at relapse and the duration of the response are major determinants of short-term outcome. In any case, for young patients the predicted overall survival is exceedingly short and novel salvage approaches should be pursued. Unfortunately, in low-grade lymphomas in general, and in FL in particular, there has been no clear-cut survival advantage of achieving a very good remission, even CR, following either first-line or salvage regimens. This is mostly due to the long survival seen in many patients with active disease and the continuous pattern of progression in patients in remission. Recent evidence, however, suggests that the quality of the remission obtained may have an impact on overall survival. Thus, molecular remissions following either hematopoietic SCT<sup>18</sup> or prolonged multidrug salvage chemotherapy<sup>19</sup> have translated into a prolongation in overall survival. These data suggest that obtaining the best remission possible may be a first step in reaching prolonged DFS and even the possibility of cures in FL in young patients with advanced disease.

We have studied a novel salvage regimen which combines drugs active against FL in previous studies. The IAPVP-16 regimen produces a high rate of responses over a relatively brief treatment period; thus, the median time to achievement of remission was only three months. Since inclusion criteria and response definitions vary somewhat from one study to another, we cannot definitively compare our response rates to those in other previously published studies<sup>8-15</sup> (Table 3), although they appear to be similar if not higher. In an effort to prolong disease-free survival following the excellent antitumor responses obtained after IAPVP-16, the protocol was amended in 1992 so that all responding patients were to proceed to SCT within three months after IAPVP-16. In this respect, we previously showed that IAPVP-16 followed by G-CSF is an excellent mobilization regimen in patients with lymphoid malignancies,<sup>20,21</sup> obtaining a mean of  $13.3 \times 10^6/\text{kg}$  CD34<sup>+</sup> cells with 1-3 leukaphereses. The excellent yield obtained with this regimen allows the concurrent treatment of the underlying lymphoma and the harvesting of sufficient cells for *ex vivo* purging of the stem cells in most patients.<sup>17</sup> Current data, however, have somewhat blunted the initial enthusiasm for autologous SCT in FL, since there appears to be no plateau in DFS after the procedure.<sup>22</sup>

The IAPVP-16 regimen produces significant hematologic toxicity with few extrahematologic side effects. Indeed, severe neutropenia lasted a median of five days with G-CSF, and 66% of treatment cycles were complicated by severe thrombocytopenia. Neutropenic fevers led to hospital readmission following 60% of treatment cycles, a rate that was reduced to 25% by intensifying the antibacterial prophylaxis.<sup>23</sup> Most patients with relapsed or refractory advanced

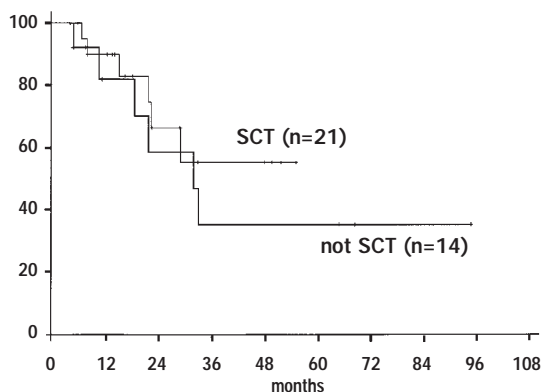


Figure 2. Progression-free survival in responders (n=35) submitted (n=21) or not submitted (n=14) to stem cell transplantation (log rank,  $p=0.44$ ).

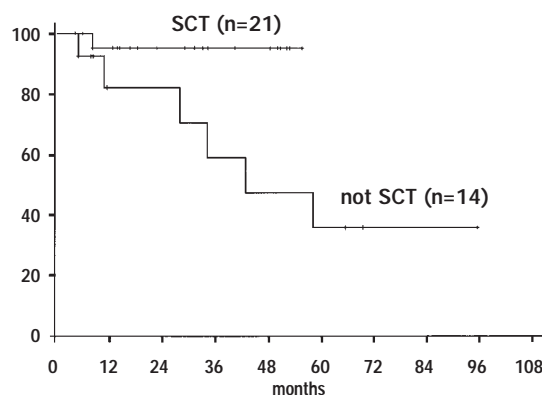


Figure 3. Overall survival in responders (n=35) submitted (n=21) or not submitted (n=14) to stem cell transplantation (log rank,  $p=0.02$ ).



**Table 3. Studies of different regimens in patients with relapsed or primary refractory follicular and other low-grade lymphomas.**

First author (year)[ref]	N° of patients	Regimen	Patients responding – no. (%)		
			CR	PR	Total
Rodriguez-Monge (1997) <sup>6</sup>	35	DHAP	4	12	16 (45)
Rodriguez-Monge (1997) <sup>6</sup>	36	ESHAP	13	14	27 (75)
Cabanillas (1987) <sup>5</sup>	91	MIME	11	39	50 (55)
Rodriguez (1995) <sup>7</sup>	36	MINE-ESHAP	20	9	29 (81)
McLaughlin (1996) <sup>8</sup>	51	FMD	24	24	48 (94)
Zinzani (1995) <sup>9</sup>	18	FMP	4	9	13 (72)
Pigaditou (1993) <sup>10</sup>	45	Fludarabine	4	16	20 (44)
Hochster (1992) <sup>11</sup>	25	Fludarabine	5	8	13 (52)
Saven et al (1996) <sup>12</sup>	23	2CdA-mitoxantrone	5	11	16 (70)
Hoffman (1994) <sup>13</sup>	21	2CdA	3	6	9 (43)
Kay (1992) <sup>14</sup>	40	2CdA	8	9	17 (43)
McLaughlin (1998) <sup>15</sup>	166	IDEC-C2B8	8	70	78 (48)

DHAP: dexamethasone, cytarabine and cisplatin. ESHAP: etoposide, methylprednisolone, cytarabine and cisplatin. MIME: methylprednisolone, ifosfamide, methotrexate and etoposide. MINE: methylprednisolone, ifosfamide, mitoxantrone and etoposide. FMD: fludarabine, mitoxantrone and dexamethasone. FMP: fludarabine, mitoxantrone and prednisone. 2CdA: 2-chlorodeoxyadenosine.

low-grade lymphoma are above the age of 60-65 years, and this may partly explain why most salvage regimens for these disorders are only mildly myelotoxic. Hematologic toxicity of IAPVP-16 is undoubtedly the major factor limiting its use in elderly patients.

In summary, the IAPVP-16 regimen obtains a high rate of complete and partial remissions in refractory or relapsed FL, allowing most eligible patients to proceed with significant tumor reduction to high-dose chemo-radiotherapy and a hematopoietic transplant.

#### Contributions and Acknowledgments

RL designed the study, was responsible for data management and prepared the manuscript. RM performed the data analysis and participated in writing the paper. SB collaborated in patient care and data management. AS collaborated in patient care and in preparation of the manuscript. AD designed the IAPVP-16 regimen. JS is the head of the Clinical Hematology Division and participated in writing the paper.

#### Disclosures

Conflict of interest: none.

Redundant publications: no substantial overlapping with previous papers.

#### Manuscript processing

Manuscript received March 22, 1999; accepted July 2, 1999.

#### References

1. Horning SJ, Rosenberg SA. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1984; 311:1471-5.
2. Gallagher CJ, Gregory WM, Jones AE, et al. Follicular lymphoma: Prognostic factors for response and survival. *J Clin Oncol* 1986; 4:1470-80.
3. Johnson PWM, Rohatiner AZS, Whelan JS, et al. Patterns of survival in patients with recurrent follicular lymphoma: a 20-year study from a single center. *J Clin Oncol* 1995; 13:140-7.
4. Cabanillas F, Hagemester FB, Bodey GP et al. IMVP-16, an effective regimen for patients with lymphoma who have relapsed after initial combination chemotherapy. *Blood* 1982; 60:693-7.
5. Cabanillas F, Hagemester FB, McLaughlin P, et al. Results of MIME salvage regimen for recurrent or refractory lymphoma. *J Clin Oncol* 1987; 5:407-12.
6. Rodriguez-Monge, Cabanillas F. Long-term follow-up of platinum-based lymphoma salvage regimens. *Hematol Oncol Clin N Am* 1997; 11:937-47.
7. Rodriguez FC, Cabanillas F, Velasquez WS, et al. Results of a salvage treatment program for relapsing lymphoma: MINE consolidated with ESHAP. *J Clin Oncol* 1995; 13:1734-41.
8. McLaughlin P, Hagemester FB, Romaguera JE, et al. Fludarabine, mitoxantrone, and dexamethasone: an effective new regimen for indolent lymphoma. *J Clin Oncol* 1996; 14:1262-8.
9. Zinzani PL, Bendandi M, Tura S. FMP regimen (fludarabine, mitoxantrone, prednisone) as therapy in recurrent low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 1995; 55:262-6.
10. Pigaditou A, Rohatiner AJ, Whelan JS, et al. Fludarabine in low-grade lymphoma. *Semin Oncol* 1993; 20:24-7.
11. Hochster HS, Kyungmann Kim, Green MD, et al. Activity of fludarabine in previously treated non-Hodgkin's low-grade lymphoma: results of an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1992; 10:28-32.
12. Saven A, Lee T, Kosty M, Piro L. Cladribine and mitoxantrone dose escalation in indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1996; 14:2139-44.
13. Hoffman M, Tallman MS, Hakimian D, et al. 2-Chlorodeoxyadenosine is an active salvage therapy in advanced indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1994; 12:788-92.
14. Kay AC, Saven A, Carrera CJ, et al. 2-Chlorodeoxyadenosine treatment of low-grade lymphomas. *J Clin*

- Oncol 1992; 10:371-7.
15. McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 1998; 16:2825-33.
  16. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84:1361-92.
  17. López R, Martino R, Sureda A, et al. Autologous stem cell transplantation in advanced follicular lymphoma. A single center experience. *Haematologica* 1999; 84: 350-5.
  18. Gribben JG, Neuberg D, Freedman AS, et al. Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl-2 translocation is associated with increased risk of relapse after autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *Blood* 1993; 81:3449-57.
  19. López-Guillermo A, Cabanillas F, McLaughlin P, et al. The clinical significance of molecular response in indolent follicular lymphomas. *Blood* 1998; 91:2955-60.
  20. Martínez C, Sureda A, Martino R, et al. Efficient peripheral blood stem cell mobilization with low-dose G-CSF (50 µg/m<sup>2</sup>) after salvage chemotherapy for lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20:855-8.
  21. Santamaría A, Martino R, Martínez C. Factors predicting an adequate mobilization of peripheral blood stem cell following IAPVP-16 + G-CSF in patients with lymphoid malignancies [abstract]. *Blood* 1998; 92 (Suppl.1):306b.
  22. Freedman AS, Gribben JG, Nadler LM. High dose therapy and autologous stem cell transplantation in follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1998; 28:219-30.
  23. Muñoz L, Martino R, Subirà M, et al. Intensified prophylaxis of febrile neutropenia with ofloxacin plus rifampicin during short-duration neutropenia in patients with lymphoma. *Leuk Lymphoma* (in press).

## 5.2. Manuscrito número 2:

### Movilización de células progenitoras a sangre periférica tras quimioterapia de rescate tipo IAPVP-16 y G-CSF en síndromes linfoproliferativos

#### 5.2.1 Resumen

En la actualidad los PHSP se utilizan con mayor frecuencia que la médula ósea en el trasplante autogénico, en diversas hemopatías y por supuesto en el caso de los LNH. El número de células CD34+ trasplantadas es un índice fiable del potencial de injerto. Según algunos trabajos, la administración de 2 a 5 x 10<sup>6</sup>/kg células CD34+ predice un prendimiento rápido y adecuado, mientras que la dosis de 1 x 10<sup>6</sup>/kg es la mínima aceptada. Para obtener un buen inóculo las pautas de movilización más efectivas son que incluyen quimioterapia y factores de crecimiento hematopoyético. En este trabajo analizamos la eficacia de un esquema poliquimioterápico original, IAPVP-16 más G-CSF, para la movilización de progenitores hematopoyéticos a sangre periférica. En un número importante de casos la pauta se utilizó como terapia de rescate según se ha descrito en el manuscrito anterior.

El esquema poliquimioterápico IAPVP-16 incluye:

- ifosfamida 5 g/m<sup>2</sup> administración ev de 2 horas, día 1.
- etopósido (VP-16), 100 mg/m<sup>2</sup> administración ev de 1 hora, días 1 a 3.
- Ara-C, 1,2 g/m<sup>2</sup> cada 12 horas administración ev de 2 horas, días 1 y 2.
- metilprednisolona, 80 mg/m<sup>2</sup> ev, días 1 a 5.

Como factor de crecimiento hematopoyético se utilizó:

- G-CSF 5 µg/kg/ d desde el día 6 del tratamiento hasta la finalización de las leucoaféresis.

En este protocolo se incluyeron 45 pacientes diagnosticados de neoplasia linfóide en recaída o con enfermedad primariamente resistente, entre ellos 16 casos de linfoma folicular. Las características de los pacientes pre-movilización se resumen en la tabla 12. En ella se incluye el tipo y estado de la enfermedad, así como el número de líneas de tratamiento previamente recibidas.

El procedimiento de leucoaféresis se inició el día que el paciente alcanzó en sangre periférica un valor superior a  $1 \times 10^9$  / l leucocitos y un número de células CD34+ de  $2.5 / \mu\text{l}$ , medidas por citometría de flujo. Se procesó diariamente un volumen mediano de 15 l por leucoaféresis hasta conseguir, si fue posible, una cifra de células CD34+  $> 3 \times 10^6/\text{kg}$ . Los productos de la aféresis se criopreservaron en nitrógeno líquido hasta el día del trasplante.

Se analizaron diversos parámetros predictivos de la obtención de un número de células CD34+ adecuado ( $> 2 \times 10^6/\text{kg}$ ) u óptimo ( $> 5 \times 10^6/\text{kg}$ ) en los productos de leucoaféresis. Para ello utilizamos el test de  $\chi^2$  y dos modelos de regresión (análisis multivariante). Además, estudiamos la relación entre la cifra de células CD34+ en sangre periférica y la obtenida en el producto de leucoaféresis mediante regresión lineal.

Se realizaron 45 procedimientos de movilización, con una mediana de 2 leucoaféresis (extremos 1-4) por paciente. Los resultados se describen en la tabla 13.

En 41 pacientes (91%) se obtuvieron más de  $2 \times 10^6$  células CD34+/Kg y en 31 (70%) más de  $5 \times 10^6/\text{kg}$ . La mediana de células CD34+ obtenidas fue de  $3,2 \times 10^6/\text{kg}$  por aféresis y de  $8,4 \times 10^6/\text{kg}$  por paciente. Es de destacar que 7 de 10 pacientes en los que habían fracasado intentos previos de movilización obtuvieron más de  $2 \times 10^6$  células/kg, en un máximo de 3 aféresis. Cuatro pacientes fracasaron (en 3 de ellos habían fracasado intentos previos).

Tabla 1. Características de los pacientes

Características	Nº pacientes (%)
Total de pacientes	45
Sexo (hombres)	29 (64%)
Edad (mediana, extremos)	40(20-65)
Enfermedad	
Linfoma folicular	16 (37%)
Linfoma del manto	2 (4%)
Linfoma difuso de células grandes	11 (24%)
Otros linfomas	5 (11%)
Enfermedad de Hodgkin	9 (20%)
Mieloma múltiple	2 (4%)
Estadio de Ann Arbor	
I	5 (11%)
II	11 (24%)
III	7 (16%)
IV	22 (50%)
Estado de la enfermedad	
Primera RC/RP	10 (22%)
> Primera RC/RP	22 (49%)
Recaída quimiosensible	13 (29%)
Radioterapia previa	10 (22%)
Nº de ciclos previos	
Uno a seis	16 (36%)
> seis	29 (64%)
Fracaso en movilización previa	10 (22%)
Cifra de neutrófilos basal	
$\leq 1.5 \times 10^9/l$	9 (20%)
$> 1.5 \times 10^9/l$	36 (80%)
Cifra de plaquetas basal	
$\leq 150 \times 10^9/l$	10 (22%)
$> 150 \times 10^9/l$	35 (78%)
Afectación de MO	17 (38%)

Tabla 13. Resultados de los procedimientos de movilización

Nº total de procedimientos	45*
Nº total de leucoaféresis	85
Mediana de células CD34+ obtenidas (extremos)	8,4 x 10 <sup>6</sup> /kg (1,1-75)
Mediana de CFU-GM obtenidas (extremos)	35 x 10 <sup>4</sup> /kg (0,8-336)
Mediana de células CD34+ obtenidas por aféresis (extremos)	3,2 x 10 <sup>6</sup> /Kg (0,25-75,9)
Resultados medios de la movilización	
Fracaso (< 2 x 10 <sup>6</sup> /kg)	4 (9%)
Adecuada (≥ 2 x 10 <sup>6</sup> /kg)	41 (91%)**
Óptima (≥ 5 x 10 <sup>6</sup> /kg)	31 (70%)
Nº leucoaféresis para una recogida adecuada (41)	
1	28 (62%)
2	9 (20%)
3	3 (7%)
>3	1 (2%)
Días desde el inicio de IAP-VP16 hasta la1ª aféresis (extremos)	12 (11-14)
Duración mediana de la neutropenia (extremos)	5 d (1-12)
Duración mediana de la trombocitopenia (extremos)	3 d (1-15)
Fiebre neutropénica	19 (42%)

\*se incluyen 4 fracasos de movilización. \*\*Se incluyen 7 de los 10 pacientes que presentaron un fracaso en movilizaciones previas.

La toxicidad hematológica fue severa pero de corta duración y se describe en la tabla 13. La toxicidad extrahematológica fue leve.

En la tabla 14 se expone el análisis de factores predictivos. Aquellos que influyeron negativamente en la recolección de células CD34+ (análisis uni y multivariante) fueron los antecedentes de fracaso en movilizaciones anteriores y un recuento plaquetario bajo ( $<150 \times 10^9/l$ ).

En lo referente a la relación entre la cifra de células CD34+ en sangre periférica y la obtenida en el producto de leucoaféresis, se halló una buena correlación entre la cifra de células CD34+ circulantes en sangre periférica el día de la aféresis y los valores de células CD34+ y de CFU-GM en los productos de leucoaféresis. ( $r=0,93$  y  $r=0,73$ ,  $P<0,001$ ). Calculamos mediante la ecuación de la regresión lineal que un número  $\geq 17$  CD34+ células /  $\mu l$  circulantes, en sangre periférica el día de la aféresis, predijo la obtención de más de  $2 \times 10^6/Kg$  células CD34+ en una sola leucoaféresis, en más del 90% de casos (figura 15).

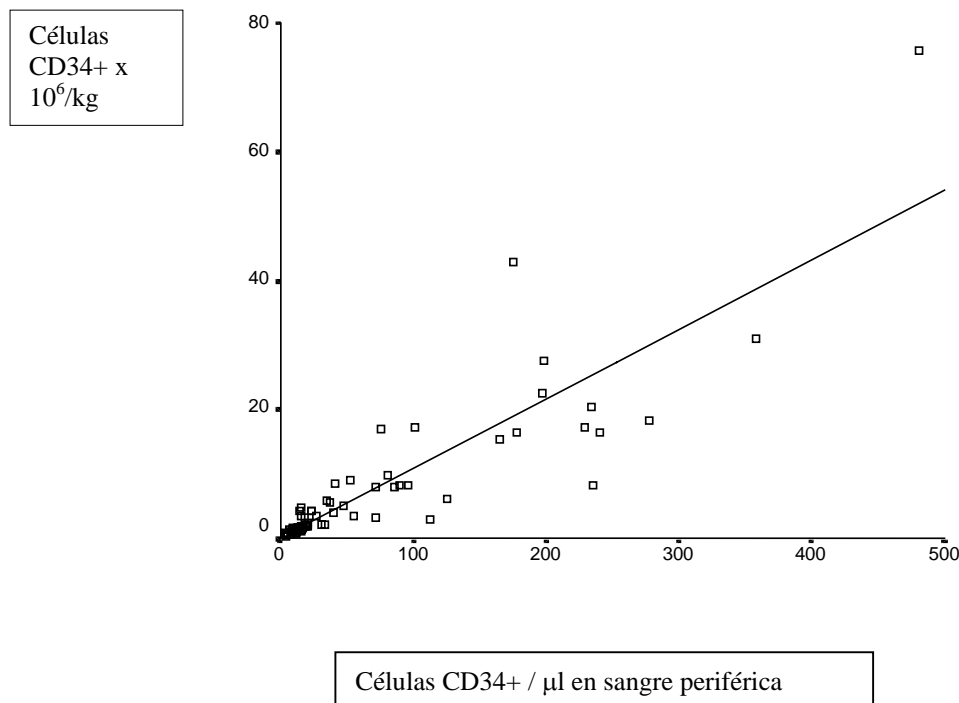


Figura 15. Regresión lineal entre células CD34+ en sangre periférica y en el producto de aféresis

Tabla 14. Factores predictivos (análisis univariante)

Movilización	Adecuada	Óptima
Edad (años)		
<50	27/29 (93,1%)	22/29 (75,9%)
≥50	14/16 (87,5%)	9/16 (56,3%)
	<b>P=0,4</b>	<b>P=0,15</b>
Sexo		
Hombres	26/29 (89,7%)	20/29 (69%)
Mujeres	15/16 (93,8%)	11/16 (68,8%)
	<b>P=0,5</b>	<b>P=0,62</b>
Tipo de Enfermedad		
LNH indolente y mieloma	18/20 (90%)	14/20 (70%)
LNH agresivo	15/16 (94%)	13/16 (81%)
Enfermedad de Hodgkin	8/9 (89%)	4/9 (44%)
	<b>P=0,9</b>	<b>P=0,16</b>
Tiempo diagnóstico-movilización		
< 1 año	12/12 (100%)	12/12 (100%)
≥ 1 año	29/33 (87,9%)	19/33(57,6%)
	<b>P=0,27</b>	<b>P=0,005*</b>
Tiempo desde último tratamiento quimioterápico		
< 1 mes	10/10 (100%)	9/10 (90%)
≥1 mes	28/32(87,5%)	20/32 (62,5%)
	<b>P=0,32</b>	<b>P=0,1</b>
Quimioterapia previa		
1 a 6 ciclos	16/16 (100%)	13/16 (81,3%)
> 6 ciclos	25/29 (86%)	18/29 (62,1%)
	<b>P=0,16</b>	<b>P=0,16</b>
Fracaso de movilización previa		
Sí	7/10 (70%)	3/10 (30%)
No	34/35 (97,1%)	28/35 (80%)
	<b>P=0,03*</b>	<b>P=0,005*</b>
RT previa		
Sí	7/10 (70%)	5/10 (50%)
No	34/35(97,1%)	26/35 (74.3%)
	<b>P=0,03*</b>	<b>P=0,14</b>
Afectación de la médula ósea		
Sí	15/17 (88,2%)	10/17 (58,8%)
No	26/28 (92,9%)	21/28 (75%)
	<b>P=0,49</b>	<b>P=0,21</b>
Recuento basal de leucocitos		
≤1,5 x 10 <sup>9</sup> /l	9/9 (100%)	6/9 (66.7%)
>1,5 x 10 <sup>9</sup> /l	32/36 (88,9%)	25/36 (69,4%)
	<b>P=0,4</b>	<b>P=0,58</b>
Recuento basal de plaquetas		
≤ 150 x 10 <sup>9</sup> /l	7/10 (70%)	4/10 (40%)
>150 x 10 <sup>9</sup> /l	34/35(97,1%)	27/35 (77,1%)
	<b>P=0,03*</b>	<b>P=0,03*</b>
Estado de la enfermedad		
Remisión completa / parcial	30/32 (93,8%)	22/32 (68,8%)
Recaída sensible	11/13 (84,6%)	9/13 (69,2)
	<b>P=0,57</b>	<b>P=0,63</b>

\* Estadísticamente significativo



En resumen, se llevaron a cabo 45 procedimientos de movilización con el esquema IAPVP-16 más G-CSF en 45 pacientes con neoplasias linfoides en fase avanzada, con una eficacia elevada. Así en el 91% de los casos se obtuvieron más de  $2 \times 10^6$  células CD34+/Kg y en el 70% más de  $5 \times 10^6$ /kg, incluidos 7 de 10 pacientes en los que habían fracasado intentos previos de movilización. Los factores que influyeron negativamente en la recolección de células CD34+ (análisis uni y multivariante) fueron los antecedentes de fracaso en movilizaciones anteriores y un recuento plaquetario bajo ( $<150 \times 10^9/l$ ). Creemos que este tratamiento está indicado especialmente en pacientes que se traten con doble autotrasplante o en aquéllos en los que se prevea selección in vitro de células CD34+, así como en pacientes con fracaso previo de otras terapias de movilización.

Finalmente, otra aportación de nuestro trabajo es el hallazgo de una correlación significativa ( $r= 0,73$ ,  $p < 0,001$ ) entre el recuento de células CD34+ en la sangre periférica y el contenido de células CD34+ y CFU-GM en el producto de aféresis. Así una cifra  $> 17$  células CD34+/ $\mu l$  en sangre periférica predijo la obtención de un número adecuado de células CD34+ en una sola leucoaféresis en la mayoría de pacientes. Por tanto, este dato se puede utilizar como criterio de inicio de los procedimientos de leucoaféresis en estos pacientes.



# Mobilization kinetics of peripheral blood progenitor cells after IAPVP-16 salvage chemotherapy plus G-CSF in lymphoproliferative disorders

A Altés<sup>1</sup>, R López<sup>1</sup>, R Martino<sup>1</sup>, C Martínez<sup>2</sup>, E Cabezedo<sup>3</sup>, L Muñoz<sup>1</sup>, A Santamaría<sup>1</sup>, G Perea<sup>1</sup>, J Briones<sup>1</sup>, A Salar<sup>1</sup>, A Sureda<sup>1</sup>, S Brunet<sup>1</sup>, P Madoz<sup>2</sup> and J Sierra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinical Hematology Division, <sup>2</sup>Hemotherapy Service, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau; and <sup>3</sup>Cancer Research Institute, Autonomous University of Barcelona, Spain

## Summary:

We have explored the efficacy of salvage chemotherapy combination, IAPVP-16 (ifosfamide 5 g/m<sup>2</sup> on day 1; VP-16 100 mg/m<sup>2</sup> on days 1–3; ara-C 1.2 g/m<sup>2</sup>/12 h on days 1 and 2; methylprednisolone 80 mg/m<sup>2</sup> on days 1–5) plus G-CSF for PBPC mobilization. This protocol was used in 45 patients with relapsed or refractory lymphoproliferative diseases who underwent 85 leukaphereses. In 41 patients >2 × 10<sup>6</sup>/kg CD34<sup>+</sup> cells were obtained after a median of two procedures. The median number of CD34<sup>+</sup> cells harvested was 3.2 × 10<sup>6</sup>/kg per apheresis and 8.4 × 10<sup>6</sup>/kg per patient. Seven of 10 patients who had failed previous mobilization attempts achieved more than 2 × 10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup> cells/kg in a maximum of three aphereses. A history of previous mobilization failure and a low platelet count (<150 × 10<sup>9</sup>/l) negatively influenced the CD34<sup>+</sup> cell yield in univariate and multivariate analyses. A good correlation was found between the circulating CD34<sup>+</sup> cells/μl and the CD34<sup>+</sup> cells and CFU-GM in the leukaphereses products ( $r = 0.93$  and  $r = 0.73$ ,  $P < 0.001$ ), and ≥17 CD34<sup>+</sup> cells/μl predicted the achievement of >2 × 10<sup>6</sup>/kg CD34<sup>+</sup> cells in a single leukapheresis in more than 90% of cases. IAPVP-16 plus G-CSF may be specially indicated in tandem transplantations or CD34<sup>+</sup> selection and in patients who have failed previous mobilization attempts. *Bone Marrow Transplantation* (2000) 26, 127–132.

**Keywords:** PBPC mobilization; lymphoma; chemotherapy

CD34<sup>+</sup> cell dose between 2 and 5 × 10<sup>6</sup>/kg as being the optimal for rapid engraftment. A threshold value of 1.0 × 10<sup>6</sup>/kg CD34<sup>+</sup> cells has been suggested as the minimum number of cells required for autologous transplantation.<sup>3</sup> To obtain an adequate harvest there is evidence that more CD34<sup>+</sup> cells can be collected following the administration of chemotherapy and growth factors than after growth factors alone.<sup>4,5</sup> Among the regimens with chemotherapy and growth factors, the combination of CY and G-CSF or GM-CSF has been the gold-standard for PBPC collection, although other schemes have been used for this purpose in lymphoma patients, and some of them could be more effective.

We have explored an original combination, IAPVP-16 plus G-CSF, as chemotherapy to decrease tumor burden<sup>6</sup> and also for PBPC mobilization. In this study we analyze the predictive factors influencing the quality of harvests obtained with this regimen, and we investigate whether the number of CD34<sup>+</sup> cells in peripheral blood (PB) adequately predicts the optimum time to start leukaphereses.

## Materials and methods

### Characteristics of the patients

Forty-five patients with relapsed or refractory lymphoma underwent PBPC harvests after salvage chemotherapy with the IAPVP-16 protocol followed by G-CSF. Patients were treated between February 1991 and March 1997, and their characteristics pre-salvage chemotherapy and mobilization are shown in Table 1. Underlying disease was diagnosed according to the REAL classification. Thirty-four patients had non-Hodgkin's lymphoma (follicular ( $n = 16$ ), mantle cell ( $n = 2$ ), diffuse large cell ( $n = 11$ ) and others ( $n = 5$ )), nine patients had Hodgkin's disease and two had multiple myeloma. Peripheral granulocyte and platelet counts pre-mobilization were ≤1.5 × 10<sup>9</sup>/l and ≤150 × 10<sup>9</sup>/l, in nine and 10 patients, respectively. Sixteen patients had received one chemotherapy regimen before IAPVP-16 and 29 more than one. At mobilization, 32 patients were in complete or partial response and 13 in chemosensitive relapse. Of the 45 patients, 17 had histopathological evidence of bone marrow involvement at mobilization. The median interval between diagnosis and mobilization was 17 months (range 7–81).

Peripheral blood progenitor cells (PBPC) are increasingly being used instead of bone marrow in autologous transplantation for hematologic malignancies.<sup>1</sup> This approach shortens the period of pancytopenia and may reduce the risks of infection and bleeding.<sup>2</sup> Enumeration of CD34<sup>+</sup> cells in PBPC harvests has been regarded as a reliable index of engraftment potential. Most groups have considered a

Correspondence: Dr A Altés, Servei d'Hematologia Clínica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni M<sup>a</sup> Claret 167, 08025 Barcelona, Spain

Received 7 February 2000; accepted 18 April 2000

**Table 1** Characteristics of the patients prior to mobilization with IAPVP-16 plus G-CSF

Number of patients	45
Sex (males)	29 (64%)
Age (median, range)	40 (20–65)
Underlying disease	
Follicular lymphoma	16 (37%)
Mantle cell lymphoma	2 (4%)
Diffuse large cell lymphoma	11 (24%)
Other lymphomas	5 (11%)
Hodgkin's disease	9 (20%)
Multiple myeloma	2 (4%)
Ann Arbor stage at mobilization	
I	5 (11%)
II	11 (24%)
III	7 (16%)
IV	22 (50%)
Disease status at mobilization	
First CR/PR	10 (22%)
>1st CR/PR	22 (49%)
Chemosensitive relapse	13 (29%)
Previous radiation therapy	10 (22%)
Previous chemotherapy	
One to six cycles	16 (36%)
More than six cycles	29 (64%)
Previous mobilization failure <sup>a</sup>	10 (22%)
ANC at mobilization	
$\leq 1.5 \times 10^9/l$	9 (20%)
$> 1.5 \times 10^9/l$	36 (80%)
Platelet count at mobilization	
$\leq 150 \times 10^9/l$	10 (22%)
$> 150 \times 10^9/l$	35 (78%)
BM involvement at mobilization	17 (38%)

CR = complete remission; PR = partial remission.

<sup>a</sup>Nine patients failed cyclophosphamide  $1.5 \text{ g/m}^2$  plus G-CSF and 1 mini-BEAM plus G-CSF.

Ten patients had failed previous mobilization attempts (G-CSF plus CY  $1.5 \text{ g/m}^2$  in nine cases and the mini-BEAM regimen plus G-CSF in one case).

### Mobilization of PBPC

All patients received salvage chemotherapy with the IAPVP-16 protocol which includes: ifosfamide  $5 \text{ g/m}^2$  i.v. on day 1; VP-16  $100 \text{ mg/m}^2$  i.v. on days 1–3; ara-C  $1.2 \text{ g/m}^2/12 \text{ h}$  i.v. on days 1 and 2; methylprednisolone  $80 \text{ mg/m}^2$  i.v. on days 1–5. Recombinant human G-CSF (Filgrastim; Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) was given at a dose of  $5 \mu\text{g/kg}$  as a single daily subcutaneous injection, from day 6 of start of chemotherapy until the end of leukaphereses.

### Collection and cryopreservation of PBPC

Leukaphereses were started when the patients reached more than  $1 \times 10^9$  WBC/l and PB counts of  $\text{CD}34^+$  cells exceeded 2.5 per  $\mu\text{l}$ . MNCs were collected by a continuous-flow blood cell separator COBE Spectra (Lakewood, CO, USA) or Fenwal CS-3000 Plus (Baxter, Barcelona, Spain).

A median volume of 15 (8–23) liters was processed per

leukapheresis with a flow rate of 60–100 ml/min. Leukaphereses were performed until a minimum target cell dose of  $3 \times 10^6/\text{kg}$   $\text{CD}34^+$  cells was collected. Each leukapheresis product was cryopreserved with a controlled freezer and stored in liquid nitrogen until the day of transplantation.<sup>7</sup>

### In vitro assays

The number of  $\text{CD}34^+$  cells present in the circulation and in the harvested products was assessed by flow cytometry (PE-8G12; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Colony-forming units granulocyte–monocyte (CFU-GM) were measured according to the Pike and Robinson agar technique.<sup>8</sup> Total numbers of colonies ( $>50$  cells) were counted under an inverted microscope after 14 days.

### Statistical analysis

Differences between categorical variables were measured by the chi-square test. Two multivariate logistic regression models were created to ascertain which variables significantly predicted the achievement of an 'adequate' (more than  $2.0 \times 10^6/\text{kg}$   $\text{CD}34^+$  cells) and 'optimal' (more than  $5.0 \times 10^6/\text{kg}$   $\text{CD}34^+$  cells) harvest. An univariate linear regression test was used to study the relation between logarithm transformation of  $\text{CD}34^+$  cells yield and peripheral  $\text{CD}34^+$  cells and CFU-GM collected in each leukapheresis. We considered the results as statistically significant when *P* values were less than 0.05.

## Results

We performed 45 mobilization procedures, with a median of two consecutive leukaphereses (1–4) on an outpatient basis. The mobilization regimen was well tolerated. The median durations of neutropenia ( $<0.5 \times 10^9/l$ ) and thrombocytopenia ( $<20 \times 10^9/l$ ) were 5 (1–12) and 3 (1–15) days, respectively. Non-hematologic toxicities were well tolerated. There were 19 episodes of neutropenic fever (14 patients required re-admission prior to apheresis) and two cases of grade 2 neurologic toxicity. The toxic re-admission rate was 31% with a mean increase in hospitalisation of 2 days. Overall results of leukaphereses and PBPC collections are summarized in Table 2. Harvesting was started at a median of 12 (11–14) days after the beginning of IAPVP-16.

Forty-one patients (91%) achieved an 'adequate' ( $\text{CD}34^+$  cells  $>2 \times 10^6/\text{kg}$ ) and 31 (70%) an 'optimal' ( $\text{CD}34^+$  cells  $>5 \times 10^6/\text{kg}$ ) harvest. Four patients (one Hodgkin's and two non-Hodgkin's lymphoma and one myeloma patients) failed to mobilize  $\text{CD}34^+$  cells in the PB. The median number of  $\text{CD}34^+$  cells harvested in the remaining cases was  $8.4 \times 10^6/\text{kg}$  (2.1–75) per patient and  $3.23 \times 10^6/\text{kg}$  (0.25–75.9) per leukapheresis. A maximum of two leukaphereses were necessary to achieve an 'adequate' number of  $\text{CD}34^+$  cells in 82% of 45 cases.

The median number of  $\text{CD}34^+$  cells harvested in the 10 patients with prior mobilization failures was  $4.14 \times 10^6/\text{kg}$  (1.14–5.48). In seven of these cases more than  $2 \times 10^6/\text{kg}$

**Table 2** Overall results of PBPC harvest (four mobilization failures are included)

Total number of mobilizations	45
Total number of leukaphereses	85
Median CD34 <sup>+</sup> cells harvested (range)	8.4 × 10 <sup>6</sup> /kg (1.1–75)
Median CFU-GM harvested (range)	35 × 10 <sup>4</sup> /kg (0.8–336)
Median CD34 <sup>+</sup> cells harvested per leukapheresis (range)	3.2 × 10 <sup>6</sup> /kg (0.25–75.9)
Overall outcome of mobilizations	
Failures (<2 × 10 <sup>6</sup> CD34 <sup>+</sup> cells/kg)	4 (9%)
Adequate (≥2 × 10 <sup>6</sup> CD34 <sup>+</sup> cells/kg) <sup>a</sup>	41 (91%) <sup>a</sup>
Optimal (≥5 × 10 <sup>6</sup> CD34 <sup>+</sup> cells/kg)	31 (70%)
No. leukaphereses for an adequate harvest (n = 41)	
1	28 (62%)
2	9 (20%)
3	3 (7%)
>3	1 (2%)
Days from start of IAPVP-16 to first apheresis (range)	12 (11–14)
Median duration of neutropenia (range)	5 days (1–12)
Neutropenic fever	19 (42%)
Median duration of thrombocytopenia (range)	3 days (1–15)

<sup>a</sup>Including seven of 10 patients who had failed previous mobilization procedures.

CD34<sup>+</sup> cells were collected, with one to three aphereses. Table 3 shows clinical and mobilization data of these 10 patients.

Table 4 shows the results of the univariate analysis of factors possibly influencing an adequate and optimal harvest after IAPVP-16 plus G-CSF. A previous mobilization failure and a pretreatment platelet count <150 × 10<sup>9</sup>/l negatively influenced the yield of these two CD34<sup>+</sup> cell targets, while prior radiotherapy and a time interval of more than 1 year from diagnosis to mobilization negatively influenced the first and second targets, respectively. Nine of 10 (90%) patients with a low platelet count have received more than six cycles of chemotherapy, and only 20 of 35 (57%) patients with a normal platelet count have been so heavily pre-treated (P = 0.05).

In two logistic regression models including the same variables, a pre-mobilization platelet count <150 × 10<sup>9</sup>/l

and previous failure of mobilization were associated with decreased CD34<sup>+</sup> cell yields in both adequate (P = 0.04 and P = 0.03) and optimal (P = 0.04 and P = 0.007) mobilizers.

A good correlation was found between logarithm transformation of early morning circulating CD34<sup>+</sup> cells/μl in PB on the day of leukapheresis and the number of CD34<sup>+</sup> cells obtained per leukapheresis (r = 0.93, P < 0.001), as is shown in Figure 1. There was also a very good correlation between the CD34<sup>+</sup> cells obtained in each leukapheresis product and the CFU-GM content (r = 0.73, P < 0.001). With these data we calculated a linear regression equation to predict the number of circulating CD34<sup>+</sup> cells required to obtain more than 2 × 10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup> cells/kg with a single leukapheresis. A threshold early morning PB CD34<sup>+</sup> count of 17 cells/μl predicted an adequate harvest in 92% of cases. This threshold was reached by 33 patients (73%).

## Discussion

The results of this study indicate that IAPVP-16 chemotherapy plus G-CSF is a highly effective regimen for mobilization of PBPC in patients with advanced lymphoma. These results confirm earlier observations in smaller numbers of patients,<sup>9</sup> even when a lower dose of G-CSF was used after chemotherapy.<sup>10</sup> An additional advantage is the effectiveness of IAPVP-16 as salvage therapy in patients with low-grade lymphoma,<sup>11</sup> thus allowing the simultaneous reduction of tumor burden and harvesting of PBPC in preparation for an autologous stem cell transplant. Of special interest is the marked predictability of the first day of mobilization, which occurred in all cases between days 11 and 14 of therapy and in 80% on day 12, thus allowing the exact scheduling of the aphereses procedures and reducing any last minute changes that alter the routine work of the apheresis unit and stem cell processing laboratory. As previously reported in detail,<sup>11</sup> the regimen has little extrahematologic toxicity, although severe pancytopenia occurs in all cases and neutropenic fever occurred in 42% of treatment cycles requiring hospital admission in 31%.

To analyze the efficacy of this mobilization regimen we chose two target doses of harvested CD34<sup>+</sup> cells. An adequate and an optimal harvest were defined as above 2 × 10<sup>6</sup>/kg and 5 × 10<sup>6</sup>/kg CD34<sup>+</sup> cells, respectively, since most studies have identified these two thresholds as being

**Table 3** Essential clinical and mobilization data of 10 patients with previous mobilization failures

Underlying disease	Previous mobilization	Prior chemotherapy	Previous radiotherapy	Platelets in PB	CD34 <sup>+</sup> cells/kg
Myeloma	CY 1.5 g/m <sup>2</sup> + G-CSF	>6 cycles	Yes	≤150 × 10 <sup>9</sup> /l	1.16
High grade NHL	CY 1.5 g/m <sup>2</sup> + G-CSF	>6 cycles	No	>150 × 10 <sup>9</sup> /l	5.09
High grade NHL	CY 1.5 g/m <sup>2</sup> + G-CSF	>6 cycles	No	>150 × 10 <sup>9</sup> /l	5.48
High grade NHL	CY 1.5 g/m <sup>2</sup> + G-CSF	>6 cycles	Yes	≤150 × 10 <sup>9</sup> /l	1.2
Hodgkin's disease	CY 1.5 g/m <sup>2</sup> + G-CSF	≤6 cycles	Yes	>150 × 10 <sup>9</sup> /l	2.64
Hodgkin's disease	CY 1.5 g/m <sup>2</sup> + G-CSF	>6 cycles	Yes	>150 × 10 <sup>9</sup> /l	1.14
Hodgkin's disease	CY 1.5 g/m <sup>2</sup> + G-CSF	>6 cycles	No	≤150 × 10 <sup>9</sup> /l	4.14
Hodgkin's disease	MiniBEAM + G-CSF	>6 cycles	No	>150 × 10 <sup>9</sup> /l	4.17
Hodgkin's disease	CY 1.5 g/m <sup>2</sup> + G-CSF	≤6 cycles	Yes	>150 × 10 <sup>9</sup> /l	3.99
Hodgkin's disease	CY 1.5 g/m <sup>2</sup> + G-CSF	>6 cycles	No	>150 × 10 <sup>9</sup> /l	5.47

**Table 4** Predictive factors for an adequate (CD34<sup>+</sup> cells  $\geq 2 \times 10^6/\text{kg}$ ) and optimal (CD34<sup>+</sup> cells  $\geq 5 \times 10^6/\text{kg}$ ) harvesting of PBPC (univariate analysis)

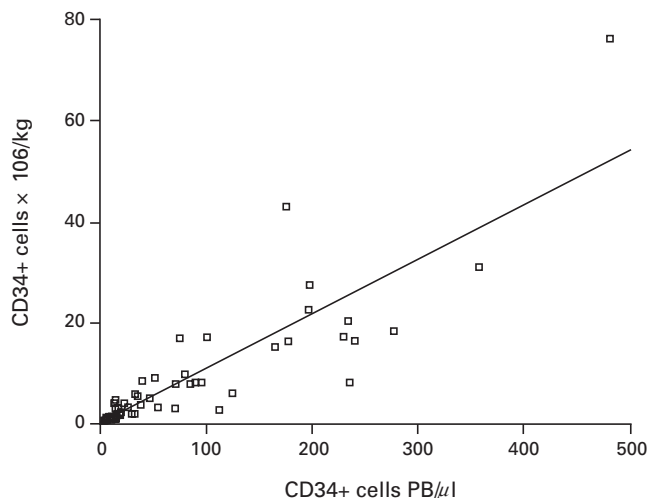
	Adequate harvest	Optimal harvest
Age (years)		
<50 years	27/29 (93.1%)	22/29 (75.9%)
$\geq 50$ years	14/16 (87.5%), <i>P</i> = 0.4	9/16 (56.3%), <i>P</i> = 0.15
Sex		
Males	26/29 (89.7%)	20/29 (69%)
Females	15/16 (93.8%), <i>P</i> = 0.5	11/16 (68.8%), <i>P</i> = 0.62
Underlying disease		
Low-grade NHL and myeloma	18/20 (90%)	14/20 (70%)
Intermediate and high NHL	15/16 (94%)	13/16 (81%)
Hodgkin's lymphoma	8/9 (89%), <i>P</i> = 0.9	4/9 (44%), <i>P</i> = 0.16
Time diagnosis–mobilization		
<1 year	12/12 (100%)	12/12 (100%)
$\geq 1$ year	29/33 (87.9%), <i>P</i> = 0.27	19/33 (57.6%), <i>P</i> = 0.005*
Time from last chemotherapy		
<1 month	10/10 (100%)	9/10 (90%)
$\geq 1$ month	28/32 (87.5%), <i>P</i> = 0.32	20/32 (62.5%), <i>P</i> = 0.1
Prior chemotherapy		
One to six cycles	16/16 (100%)	13/16 (81.3%)
More than six cycles	25/29 (86%), <i>P</i> = 0.16	18/29 (62.1%), <i>P</i> = 0.16
Previous mobilization failure		
Yes	7/10 (70%)	3/10 (30%)
No	34/35 (97.1%), <i>P</i> = 0.03*	28/35 (80%), <i>P</i> = 0.005*
Previous radiotherapy		
Yes	7/10 (70%)	5/10 (50%)
No	34/35 (97.1%), <i>P</i> = 0.03*	26/35 (74.3%), <i>P</i> = 0.14
Bone marrow involvement		
Yes	15/17 (88.2%)	10/17 (58.8%)
No	26/28 (92.9%), <i>P</i> = 0.49	21/28 (75%), <i>P</i> = 0.21
Baseline WBC count		
$\leq 1.5 \times 10^9/\text{l}$	9/9 (100%)	6/9 (66.7%)
$> 1.5 \times 10^9/\text{l}$	32/36 (88.9%), <i>P</i> = 0.4	25/36 (69.4%), <i>P</i> = 0.58
Baseline platelet count		
$\leq 150 \times 10^9/\text{l}$	7/10 (70%)	4/10 (40%)
$> 150 \times 10^9/\text{l}$	34/35 (97.1%), <i>P</i> = 0.03*	27/35 (77.1%), <i>P</i> = 0.03*
Disease status		
Complete or partial remission	30/32 (93.8%)	22/32 (68.8%)
Chemosensitive relapse	11/13 (84.6%), <i>P</i> = 0.57	9/13 (69.2%), <i>P</i> = 0.63

\*Statistically significant.

the minimum safe number of PBPC and the optimal number for rapid trilineage engraftment, respectively.<sup>12,13</sup> More than 90% of our patients achieved an adequate and 70% an optimal harvest, including 7/10 who had failed a previous mobilization attempt. In nine of these 10 patients the previous mobilization chemotherapy used was CY 1.5 g/m<sup>2</sup>. It is possible that a more intensive dose of CY would have had the same effect as IAPVP-16 in mobilizing progenitor cells. Nevertheless, these high harvests with a median of only two leukapheresis procedures make this regimen especially attractive for patients who are included in tandem transplant protocols or when CD34<sup>+</sup> cell selection of PBPC is planned. Similar results have been reported with other combination chemotherapy regimens including ifosfamide and etoposide plus G-CSF.<sup>3,14</sup> Using single-agent high-dose CY (4 g/m<sup>2</sup>) plus G-CSF in patients with advanced lymphoid malignancies, Rosenfeld *et al*<sup>15</sup> harvested a median of 13.8 x 10<sup>6</sup>/kg CD34<sup>+</sup> cells but with a

median of seven apheresis procedures. The median yield per procedure thus appears to be higher with our regimen, although direct comparisons should be avoided since the patient populations may in fact differ in relevant prognostic factors for mobilization efficacy as well as technical differences in venous access and/or the apheresis procedure itself.

Of particular importance in clinical practice is the identification of patients who have an increased risk of failing to mobilize PBPC. In our series of patients factors adversely affecting the achievement of an adequate and/or optimal harvest were a previous mobilization failure, a baseline platelet count below 150 x 10<sup>9</sup>/l, prior radiotherapy and a time interval from diagnosis to mobilization of more than 1 year. These prognostic factors have been identified in previous studies,<sup>4,16–20</sup> although well-known variables such as the number of prior courses of chemotherapy were not significant in our study.<sup>21</sup> It is interesting that our thrombopenic



**Figure 1** Linear regression between CD34<sup>+</sup> cells/ $\mu$ l count in peripheral blood and CD34<sup>+</sup> cells  $\times$  10<sup>6</sup>/kg harvested.

patients were heavily pre-treated in 90% of cases. Probably, thrombopenia is a very good index of bone marrow damage secondary to previous chemotherapy, and predicts with high accuracy poor mobilizations. This parameter, however, has been previously analyzed only by Weaver *et al*,<sup>20</sup> who found it to be the most important predictive factor in a large group of patients mobilized with CY, etoposide and G-CSF.

We found a good correlation between the early morning PB CD34<sup>+</sup> cell count and the content of CD34<sup>+</sup> cells ( $r = 0.93$ ,  $P < 0.001$ ) and CFU-GM ( $r = 0.73$ ,  $P < 0.001$ ) in the same day harvested product. This correlation has been observed by other authors<sup>15,22–24</sup> and forms the basis of the widely accepted routine practice of guiding the timing of leukaphereses based on the daily PB CD34<sup>+</sup> counts. A threshold of 17 CD34<sup>+</sup> cells/ $\mu$ l in PB predicted the achievement of an adequate harvest with a single leukapheresis in most patients (31/33 patients who reached this threshold). Other authors have identified such threshold values for a target cell dose of 1–3  $\times$  10<sup>6</sup>/kg (see Table 5). As seen, the threshold count varies from one study to another, as well as the percentage of patients who actually reach this value. Again, direct comparisons should be avoided since the patient populations and mobilization regimens probably differ in relevant prognostic factors, as well as technical differences in the systems of CD34<sup>+</sup> cell quantification, different priming methods, different volume processed per leukapheresis, etc.

**Table 5** Prediction of the number of CD34<sup>+</sup> cells harvested in a single leukapheresis from the numbers of CD34<sup>+</sup> cells/ $\mu$ l in peripheral blood

Author/Ref.	CD34 <sup>+</sup> cells/ $\mu$ l	CD34 <sup>+</sup> cells $\times$ 10 <sup>6</sup> /kg
Haas <i>et al</i> <sup>16</sup>	50	2.5
Armitage <i>et al</i> <sup>22</sup>	20	2
Engelhardt <i>et al</i> <sup>23</sup>	50	3
Díaz <i>et al</i> <sup>24</sup>	30	1
Current study	17	2

In summary, IAPVP-16 chemotherapy followed by G-CSF is a highly effective mobilization regimen for patients with advanced lymphoma. Effective tumor cytoreduction can be coupled with a very predictable PBPC harvesting, and most patients who will not obtain an adequate harvest can be identified by simple characteristics such as prior mobilization failures and a baseline low platelet count. Additionally, the early morning CD34<sup>+</sup> PB count highly correlates with the cell yield in the same day leukapheresis procedure.

### Acknowledgements

This study was supported in part by grant FIS 97/0626 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad y Consumo and a grant from Fundación Ramón Areces (JS/1997–1999).

### References

- 1 Gratwohl A, Hermans J, Baldomero H. Blood and marrow transplantation activity in Europe 1995. European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant* 1997; **19**: 407–419.
- 2 To LB, Roberts MM, Haylock DN *et al*. Comparison of haematological recovery times and supportive care requirements of autologous recovery phase peripheral blood stem cell transplants, autologous bone marrow transplants and allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant* 1992; **9**: 227–284.
- 3 Russell NH, McQuaker G, Stainer C *et al*. Stem cell mobilisation in lymphoproliferative diseases. *Bone Marrow Transplant* 1998; **22**: 935–940.
- 4 Bensinger WI, Longin K, Appelbaum F *et al*. PB stem cells (PBSCs) collected after recombinant granulocyte colony-stimulating factor (rh G-CSF): an analysis of factors correlating with the tempo of engraftment after transplantation. *Br J Haematol* 1994; **87**: 825–831.
- 5 To LB, Haylock D, Simmons PJ, Juttner C. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 1997; **89**: 2233–2258.
- 6 Lopez R, Martino R, Sureda A *et al*. Autologous stem cell transplantation in advanced follicular lymphoma. A single center experience. *Haematologica* 1999; **84**: 350–355.
- 7 Garcia J, Martinez E. La criopreservación de precursores hematopoyéticos: su papel en Hematología y Oncología. *Biol Clin Hematol* 1983; **5**: 99–107.
- 8 Pike BL, Robinson WA. Human bone marrow colony growth in agar gel. *J Cell Physiol* 1970; **76**: 77–84.
- 9 Martinez C, Mateu R, Sureda A *et al*. Peripheral blood stem cell mobilization following salvage chemotherapy (IAPVP-16) plus granulocyte colony-stimulating factor and autografting for non-Hodgkin's lymphoma. *Transplant Proc* 1995; **27**: 2355–2356.
- 10 Martinez C, Sureda A, Martino R *et al*. Efficient peripheral blood stem cell mobilization with low-dose G-CSF (50  $\mu$ g/m<sup>2</sup>) after salvage chemotherapy for lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1997; **20**: 855–858.
- 11 Lopez R, Martino R, Brunet S *et al*. Salvage chemotherapy with IAPVP-16 for advanced refractory or relapsed follicular lymphomas. *Haematologica* 1999; **84**: 911–916.
- 12 Bender J, To LB, Williams S, Schwartzberg L. Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematother* 1992; **1**: 329–334.

- 13 Haynes AP, Hunter A, McQuaker G *et al*. Engraftment characteristics of peripheral blood stem cells mobilised with cyclophosphamide and the delayed addition of G-CSF. *Bone Marrow Transplant* 1995; **16**: 359–363.
- 14 Moskowitz CH, Bertino JR, Glassman JR *et al*. Ifosfamide, carboplatin, and etoposide: a highly effective cytoreduction and peripheral-blood progenitor-cell mobilization regimen for transplant-eligible patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 3776–3785.
- 15 Rosenfeld CS, Shaddock RK, Zeigler ZR *et al*. Cyclophosphamide-mobilized peripheral blood stem cell in patients with lymphoid malignancies. *Bone Marrow Transplant* 1995; **15**: 433–438.
- 16 Haas R, Möhle R, Frühauf S *et al*. Patients characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. *Blood* 1994; **83**: 3787–3794.
- 17 Olivieri A, Offidani M, Ciniero L *et al*. Optimization of the yield of PBSC for autotransplantation mobilized by high dose chemotherapy and G-CSF: proposal for a mathematical model. *Bone Marrow Transplant* 1994; **14**: 273–278.
- 18 Koumakis G, Vassilomanolakis M, Hatzichristou H *et al*. Predictive factors affecting mobilization and peripheral blood stem cell (PBSC) collection using single leukapheresis (SA) for rescuing patients after high-dose chemotherapy (HD.CHE) in various malignancies. *Bone Marrow Transplant* 1996; **18**: 1065–1072.
- 19 McQuaker IG, Haynes AP, Stainer C *et al*. Stem cell mobilization in resistant or relapsed lymphoma: superior yield of progenitor cells following a salvage regimen comprising ifosfamide, etoposide and epirubicin compared to intermediate-dose cyclophosphamide. *Br J Haematol* 1997; **98**: 228–233.
- 20 Weaver CH, Schwartzberg LS, Birch R *et al*. Collection of peripheral blood progenitor cells after the administration of cyclophosphamide, etoposide, and granulocyte-colony-stimulating factor: an analysis of 497 patients. *Transfusion* 1997; **37**: 896–903.
- 21 Watts MJ, Sullivan AM, Jamieson E *et al*. Progenitor-cell mobilization after low-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor: an analysis of progenitor-cell quantity and quality and factors predicting for these parameters in 101 pretreated patients with malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 1997; **15**: 535–546.
- 22 Armitage S, Hargreaves R, Samson D *et al*. CD34 counts to predict the adequate collection of peripheral blood progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 1997; **20**: 587–591.
- 23 Engelhardt M, Winkler J, Waller C *et al*. Blood progenitor cell (BPC) mobilization studied in multiple myeloma, solid tumor and non-Hodgkin's lymphoma patients after combination chemotherapy and G-CSF. *Bone Marrow Transplant* 1997; **19**: 529–537.
- 24 Díaz MA, Garcia-Sanchez F, Lillo R *et al*. Large-volume leukapheresis in pediatric patients: pre-apheresis peripheral blood CD34<sup>+</sup> cell count predicts progenitor cell yield. *Haematologica* 1999; **84**: 32–35.

### 5.3. Manuscrito número 3:

#### Trasplante autogénico de progenitores hematopoyéticos en linfoma folicular en fase avanzada

##### 5.3.1. Resumen

La utilización de terapia intensiva con soporte de progenitores hematopoyéticos autogénicos se investiga como tratamiento de los pacientes con linfoma folicular y pronóstico de supervivencia desfavorable.

En nuestro centro, 30 pacientes consecutivos diagnosticados de linfoma folicular en fase avanzada recibieron un trasplante autogénico de progenitores hematopoyéticos. Las características de los pacientes se detallan en la tabla 15. Veintisiete pacientes habían recibido quimioterapia de rescate antes del trasplante con el objetivo de alcanzar la mejor respuesta posible, 23 de ellos se habían tratado con IAPVP-16.

El estado de la enfermedad previo al trasplante fue la primera remisión completa en 7, la segunda o posterior remisión completa en 6, una remisión parcial en 10, una recaída no tratada en 2 y enfermedad quimio-resistente en 5.

La fuente de PH fue en 8 casos la médula ósea y en 22 la sangre periférica. En 13 casos los PH se trataron "ex vivo" con un método inmunomagnético que utiliza anticuerpos anti-B para la depleción de células B. Se obtuvo una mediana de depleción de células B en médula ósea de 1,86 log (extremos 1,37 a > 2,02) y en SP de 1,23 log (extremos 0,3 a > 2,13).

La mediana de células CD34+ infundidas de MO fue de  $5,23 \times 10^6/\text{kg}$  en los casos no tratados, y de  $1,39 \times 10^6/\text{kg}$  en los tratados "ex vivo". En los TPH de SP la mediana de células CD34+ infundidas en los casos no tratados fue de  $12 \times 10^6/\text{kg}$  y en los no tratados de  $6,5 \times 10^6/\text{kg}$ .



Tabla 15. Características de los pacientes

Características	Nº
Total de pacientes	30
Hombres/Mujeres	17/13
Edad mediana (extremos)	45 años (30-62)
Histología	
Folicular, nodular	24
Folicular, difuso	4
Folicular, transformado a LDCG	2
Estadio al diagnóstico	
II	1
III	7
IV	22
Tiempo mediano diagnóstico - TAPH (extremos)	29 m (11-97)
Número mediano de terapias previas (extremos)	2 (1-4)
RT previa	3
Tratamiento de rescate pre-TAPH	27
Estado de la enfermedad	
1ª remisión completa	7
2ª remisión completa	6
1ª remisión parcial	4
2ª remisión parcial	6
Recaída no tratada	2
Enfermedad resistente	5
PHMO	8
Tratados	4
No tratados	4
PHSP	22
Tratados	9
No tratados	13

LDCG: Linfoma difuso de células grandes. TAPH: trasplante autogénico de progenitores hematopoyéticos. PHMO: progenitores hematopoyéticos de médula ósea. PHSP: progenitores hematopoyéticos de sangre periférica. RT: radioterapia.

El acondicionamiento utilizado fue ciclofosfamida más irradiación corporal total en 29 casos y el esquema poliquimioterápico BEAM en un paciente.

Los parámetros analizados en este trabajo fueron:

1. Respuesta antitumoral en términos de respuesta completa, parcial o no-respuesta
2. Toxicidad relacionada con el tratamiento
3. Intervalo libre de progresión (ILP) postrasplante definido como el tiempo transcurrido desde el día del trasplante hasta la recaída, progresión, fallecimiento o el último seguimiento. Este intervalo se comparó con el último obtenido en cada paciente, previo a la terapia de rescate utilizada antes del trasplante.
4. Supervivencia libre de progresión (SLP), definida como el tiempo transcurrido desde el día del trasplante hasta la recaída o la progresión de la enfermedad, el fallecimiento o el último seguimiento.
5. Supervivencia global (SG), definida como el tiempo transcurrido desde el día del trasplante hasta el fallecimiento o el último seguimiento.

La SLP y la SG se calcularon según el método de Kaplan-Meier. También se realizó un estudio multivariante con diversas variables, para hallar factores predictivos de progresión y supervivencia postrasplante. Las variables analizadas fueron: la edad inferior o superior a 45 años, el sexo, el tiempo desde el diagnóstico al trasplante mayor o menor de 29 meses, la RC frente a la no-obtención de RC, el número de ciclos recibidos (1-2 frente a 2-4), la quimiosensibilidad, la fuente de PH, y el tratamiento "ex vivo" de éstos.

Respuesta antitumoral

La respuesta obtenida con el tratamiento intensivo se recoge en la tabla 16.

Con una mediana de seguimiento de 19 meses (extremos 1-89), 27 pacientes estaban vivos y 8 recayeron o progresaron, con una mediana de tiempo hasta la recaída de 11 meses (extremos 6-22) postrasplante.

Tabla 16. Seguimiento postrasplante

	Pretrasplante nº (%)	Postrasplante 3 meses nº (%)	Ultimo seguimiento nº (%)
Remisión Completa	13 (43)	24 (80)	20 (67) <sup>a</sup>
Remisión Parcial	10 (33)	4 (13)	2 (7) <sup>a</sup>
Enfermedad resistente	5 (17)	-	-
Vivo en progresión	-	-	5 <sup>b</sup>
Recaída no tratada	2 (7)	-	-
Muertes relacionadas con el tratamiento	-	1	1
Muertes relacionadas con progresión	-	-	2 <sup>b</sup>
Pacientes no evaluables para respuesta	-	1	-

<sup>a</sup>Seguimiento mediano en los pacientes en RC/RP: 17 (1-89) meses

<sup>b</sup>Mediana de tiempo hasta la progresión: 11 (6-22) meses (un paciente en RC tras irradiación craneal)

Recuperación hematológica y toxicidad relacionada con el tratamiento:

- Todos los pacientes alcanzaron la recuperación neutrofilica (neutrófilos  $> 0.5 \times 10^9/l$ ) y plaquetaria (plaquetas  $> 20 \times 10^9/l$ ) en una mediana de 14 días.
- Sólo hubo una muerte relacionada con el procedimiento (un mes después del trasplante) que corresponde a una mortalidad del 3%.
- El 97% de los pacientes desarrollaron fiebre neutropénica y dos de ellos neumonía.
- La toxicidad no hematológica fue reversible
- En el tiempo de seguimiento de este trabajo no aparecieron complicaciones tardías como síndrome mielodisplásico o leucemia aguda.

Supervivencia libre de progresión y supervivencia global:

La supervivencia global estimada a 2 años fue del 83% (IC95%, 64%-100%) y la supervivencia libre de progresión del 57% (IC95%, 34%-81%), (figura.16). Ninguna variable analizada fue predictiva de la progresión o la supervivencia en nuestro estudio.

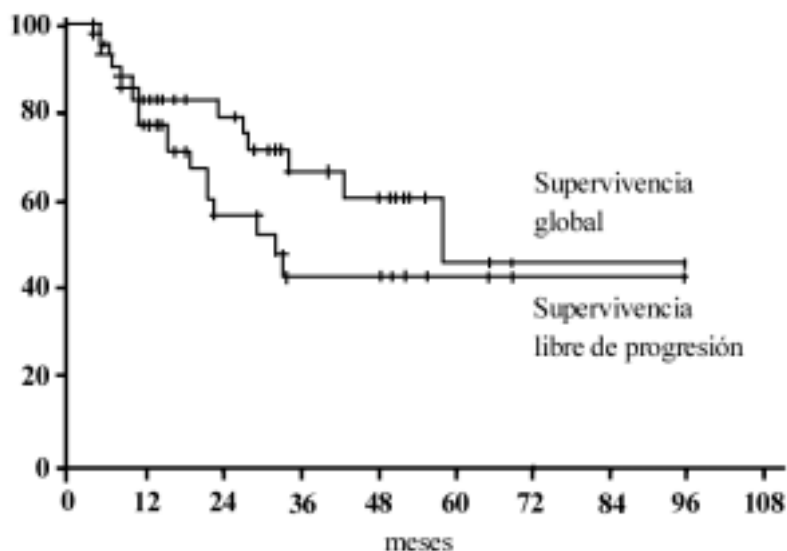


Figura 16. Supervivencia global y supervivencia libre de progresión

Comparación del intervalo libre de progresión preterapia de rescate seguido de trasplante y postrasplante (tabla 17):

- Diecisiete pacientes evaluables
- Diez tenían un intervalo libre de progresión mayor postrasplante
- Cinco se hallaban en remisión pero con un seguimiento que aún no había superado la duración de la respuesta pretrasplante.
- En dos pacientes la duración del tiempo libre de progresión fue más corta tras el trasplante.

**Tabla 17. Comparación del Intervalo libre de progresión pre y postrasplante**

---

*Evaluable para conversión*

	10
LP postrasplante > pretrasplante	
RC/RP pero sin alcanzar conversión	5
ILP postrasplante < pretrasplante	2

*No Evaluable para conversión*

Trasplante en primera respuesta	5
Muerte temprana relacionada con el tratamiento	1
Enfermedad primariamente refractaria en RC/RP postrasplante	7

---

ILP: Intervalo libre de progresión.

Por lo tanto, se obtuvo un importante número de respuestas que fueron de mayor duración que las alcanzadas previamente.

Concluimos que la terapia intensiva seguida de trasplante de progenitores hematopoyéticos autogénicos, obtiene un alto porcentaje de remisiones, que con frecuencia se prolongan en el tiempo más que las obtenidas con anterioridad. En nuestro estudio, ninguna variable analizada fue predictiva de progresión o supervivencia. Sería necesario un seguimiento más prolongado para determinar si se alcanza un "plateau" en la duración de la respuesta y definir qué proporción de pacientes podría ser curarse con este procedimiento.



## Autologous stem cell transplantation in advanced follicular lymphoma. A single center experience

ROSARIO LÓPEZ, RODRIGO MARTINO, ANNA SUREDA, JOSEP NOMDEDÉU, JAVIER BRIONES, GREGORIO MARTIN-HENAO,\* JUAN GARCÍA,\* SALUT BRUNET, JORGE SIERRA

Clinical Hematology Division, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau; \*Institut de Recerca Oncològica, Barcelona, Spain

### ABSTRACT

**Background and Objective.** The use of intensive therapy supported by autologous stem cell transplantation (ASCT) is being investigated as treatment for poor-prognosis follicular lymphomas (FL). A single-center experience is herein reported.

**Design and Methods.** From September 1990 to October 1997, 30 consecutive patients (pts) with advanced FL received transplants, 8 of bone marrow and 22 of peripheral blood. Thirteen harvests were purged by an immunomagnetic method using anti-B antibodies. Twenty-seven patients received salvage chemotherapy (CT) before ASCT with the objective of reaching this procedure in the best possible response. The disease status at ASCT was: 1<sup>st</sup> CR in 7 pts,  $\geq 2^{\text{nd}}$  CR in 6 pts, PR in 10 pts, untreated relapse in 2 pts and chemoresistant disease in 5 pts.

**Results.** There was only one transplant-related death (one month after ASCT). With a median follow-up of 19 (1-89) months, 27 pts are alive, 8 pts have relapsed/progressed at a median time of 11 (6-22) months after ASCT. The estimated 2-year PFS and OS are 57% (95% CI, 34-81%) and 83% (95% CI, 64-100%). When comparing the progression-free interval (PFI) before salvage CT and ASCT and the PFI after ASCT, of 17 evaluable pts, 10 had a PFI after ASCT longer than the previous interval, and 5 additional pts remain in CR/PR with a follow-up that has not yet reached the duration of pre-transplant response. By contrast, 2 pts had a short post-transplant response.

**Interpretation and Conclusions.** High-dose therapy followed by ASCT obtains a high rate of responses, frequently longer than any previous PFI. Additional follow-up is necessary to determine whether there is any "plateau" in response duration and to define what proportion of pts may be cured with ASCT in this setting.

©1999, Ferrata Storti Foundation

Key words: ASCT, follicular lymphoma

Correspondence: Rosario López, M.D., Servei d'Hematologia Clínica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Av. Sant Antoni Maria Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain.  
Phone: international + 34-3-2919396 - Fax: international + 34-3-2919466 - E-mail: 28429rls@comb.es

Follicular lymphomas (FL) are the most frequent of the low-grade or indolent lymphomas. Even in advanced stages, FL usually respond to initial conventional chemo-radiotherapy, but subsequent relapse or progression occurs in virtually all patients over the following months. Durable remissions are infrequent and progression to an advanced, unresponsive phase is almost constant.<sup>1-3</sup> The use of intensive therapy supported by autologous hematopoietic stem cell transplantation (ASCT) is being investigated in FL. Young patients with advanced disease and expected short progression-free and overall survival seem to be the best population for this procedure, with the hope of prolonging these intervals. Although initial results of ASCT appeared promising, the indolent course of these lymphomas precludes any definite conclusions based on short-term observations.<sup>4-14</sup> For this reason the benefit of ASCT in FL remains unproven. Greater complexity has been added with the introduction of sophisticated *in vitro* purging methods aimed at eliminating lymphoma cells. The clinical impact of using these purged products is controversial.<sup>14-16</sup>

We studied the role of high-dose therapy supported by ASCT in patients with primary refractory or relapsed advanced FL. The main parameter analyzed was whether the progression-free interval (PFI) after transplantation was longer than the last PFI before the procedure. We also evaluated overall survival (OS), progression-free survival (PFS) and procedure-related toxicity.

### Design and Methods

#### Inclusion criteria

Patients with advanced FL defined according to the REAL classification were eligible for ASCT, with central histology review for referred patients; histologic samples from patients treated before 1995 were reviewed to confirm the diagnosis of FL according to the REAL classification. Patients with relapsed or refractory disease, and patient in first response if refractory to front-line CT with CHOP, were included. Only exceptionally were patients with FL transplanted for chemoresistant disease. Most consecutive patients treated at our institution with relapsed

**Table 1. Patients' characteristics.**

Characteristics	No.
Total no. of patients	30
Sex	17 M /13 F
Median age (range)	45 yrs. (30-62)
Histology	
Follicular, nodular	24
Follicular, diffuse	4
Follicular, transformed to DLCL	2
Stage at diagnosis	
II	1
III	7
IV	22
Median time from diagnosis to ASCT (range)	29 mo.(11-97)
Median number of prior CT regimens (range)	2 (1-4)
Prior radiotherapy	3
Salvage therapy pre-ASCT	27
Disease status at ASCT	
1 <sup>st</sup> complete remission	7
≥2 <sup>nd</sup> complete remission	6
1 <sup>st</sup> partial remission	4
2 <sup>nd</sup> partial remission	6
Untreated relapse	2
Chemoresistant	5
BMT	8
Purged	4
Unpurged	4
PBSCT	22
Purged	9
Unpurged	13

DLCL: diffuse large cell lymphoma; ASCT: autologous stem cell transplant; CT: chemotherapy.

FL were eligible, provided that they had chemosensitive or untreated disease, and that at least  $2 \times 10^8$ /kg nucleated cells were available for BMT or  $2 \times 10^6$ /kg CD34<sup>+</sup> cells for peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT). No transplantation for FL at our institution has been excluded from this report.

### Patients

Patients had to be between 18 and 65 years of age and have adequate organ function in order to undergo ASCT. Thirty patients were judged appropriate candidates and received an ASCT between September

1990 and October 1997. The main characteristics of the series appear in Table 1. Twenty-seven patients received salvage CT before ASCT with the objective of reaching the transplant in the best possible response; most of these patients (n=23) received the IAPVP-16 regimen.<sup>17</sup> Restaging confirmed the achievement of at least a PR in 23 cases and less than a PR in four cases.

### Bone marrow and peripheral blood stem cell harvests

BM harvest was done in eight patients, while the remaining 22 received PBSC. Thirteen harvests (4 BM and 9 PBSC) were immunologically purged using immunomagnetic beads coated with sheep anti-mouse immunoglobulins (Dynabeads<sup>®</sup> M450, DYNAL, Oslo, Norway) and a cocktail of monoclonal antibodies CD19, CD20, CD22, CD23 and CD37 (Baxter<sup>®</sup>).<sup>18,19</sup> Results of the purging strategy were analyzed with nested PCR amplification of the major breakpoint region (MBR) and minor cluster region (mcr) of the bcl-2/IgH rearrangement for t(14;18) translocation, both in initial, adsorbed (positive) and final fractions. The log depletion was calculated as the log of the ratio of initial absolute number of target antigen-positive cells/final absolute number of target antigen-positive cells.

The median number of nucleated cells (NC) and CD34<sup>+</sup> cells infused are given in Table 2. The B-cell depletion obtained with the immunomagnetic method ranged from 1.37 to >2.02 log reduction (median >1.86) in ABMT and 0.3 to >2.13 log (median >1.23) in PBSCT, with a median yield of 64.5% (range 53.2-74) NC and 78.5% (range 63.8-94.1) CD34<sup>+</sup> cells during the purging procedure in the case of ABMT. In APBSCT the median NC yield was 76.9% (range 64.7-87.5) and the median CD34<sup>+</sup> cells yield 71.6% (range 61.5-98.6).

### Conditioning regimen

Twenty-nine of the 30 patients received cyclophosphamide (60 mg/kg on two consecutive days) plus hyperfractionated TBI (2-2.5 Gy per fraction, twice daily on three consecutive days for a total of 12-13.5 Gy). One patient received the BEAM regimen (BCNU, VP-16, Ara-C and melphalan). After ASCT one

**Table 2. Results of bone marrow and peripheral blood stem cell harvests.**

	Bone marrow				Peripheral blood stem cells			
	Total	Unpurged	Purged	p	Total	Unpurged	Purged	p
<b>Nucleated cells/kg (10<sup>6</sup>)</b>								
Median	1.50	2.77	0.47	0.2	5.79	8.01	3.53	0.03
Range	0.14-17.80	1.90-17.80	0.14-1.10		1.83-12.80	2.25-12.80	1.83-7.41	
<b>CD34<sup>+</sup>/kg (10<sup>6</sup>)</b>								
Median	1.60	5.23	1.39	0.4	7.71	12	6.50	0.05
Range	0.66-8.90	1.57-8.90	0.66-2.70		3.80-44.10	3.80-44.10	3.80-16.40	



patient received local radiotherapy due to pre-transplant bulky abdominal disease.

### Supportive measures

Patients were treated in private rooms with reverse isolation and a diet low in bacteria and fungi. They did not receive either antibacterial or antifungal prophylaxis; antiviral prophylaxis consisted of oral acyclovir. Parenteral antibiotics were started if there was fever  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  during neutropenia and maintained until the patient was afebrile for at least 3 days. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) was given when clinically indicated.

### Response criteria

Before and 3 and 12 months after ASCT, disease response was assessed with standard radiologic and histologic methods and was defined as follows: complete remission (CR) was when there was no measurable disease and no BM involvement by conventional histology; partial response (PR) consisted of decrease by at least 50% of all measurable lesions before treatment with BM involvement of less than 20%; the no response (NR) category included cases not qualifying for PR or progressive disease (PD); finally, PD reflected involvement of new sites after treatment, recurrence in originally involved sites, increase by more than 25% in original tumor masses and/or reappearance of detectable BM involvement.

### Statistical considerations

The main parameters analyzed were transplant-related toxicity, response, progression-free interval, comparison of PFI after ASCT with the last PFI pre-ASCT to assess possible conversion of remission duration by the transplant, PFS (interval from day of ASCT until relapse, disease progression, death or last follow-up) and OS (interval from the day of ASCT until death or last follow-up). The closing date for analysis was March 31, 1998. Continuous variables were compared by non-parametric tests (Mann-Whitney's U test). Time dependent events were analyzed with the Kaplan-Meier method, and the log-rank test was used to assess univariable prognostic factors. Multivariable analysis was performed by means of the Cox proportional hazards method.

## Results

### Hematologic recovery

All patients engrafted ( $\text{ANC} > 0.5 \times 10^9/\text{L}$ ) at a median of 14 (range 9-31) days and recovered platelets  $> 20 \times 10^9/\text{L}$  at a median of 14 (7-70) days post-transplant. The median times to neutrophil and platelet recovery in purged and unpurged SCT were: neutrophils on day +14 (10-31) and +13 (9-17) ( $p = \text{NS}$ ), respectively; platelets on day +17 (8-70) and +13 (7-46) ( $p = \text{NS}$ ), respectively. APBSCT recipients and ABMT recipients engrafted neutrophils at a median of 13 (9-31) days and 15 (11-25) days post-

transplant ( $p = \text{NS}$ ), respectively; platelet recovery occurred at a median of 13 (9-46) days and 24 (13-70) days ( $p = 0.005$ ), respectively.

### Toxicity

After ASCT 29 of 30 (97%) patients developed neutropenic fever, with two cases of pneumonia. There was one transplant-related death (3%) due to idiopathic pneumonia, one month after ASCT. There were no other significant procedure-related toxicities, nor have there been any late complications such as secondary myeloid malignancies.

### Response and survival after ASCT

One patient died (day +37) and was unevaluable for response. Disease status at various time intervals in the remaining 29 patients is shown in Table 3. At 3 months post-transplant 24 patients were in CR (including 13 patients who were in CR before transplant), four in PR and one was not evaluated at 3 months. Eight patients have progressed or relapsed at a median of 11 months after the procedure (range 6 to 22 months); two of them have died, one is in CR at 46 months+ after cranial irradiation of a central nervous system relapse and the other five are alive with disease at a median of 16 months (8-22) from progression. One of the patient with transformed disease is alive in remission and the other is dead from progression. With a median follow-up of 19 (1-89) months, 27 patients are alive, 20 in CR, two in PR and five with active disease under palliative therapy. Figures 1 and 2 show the Kaplan-Meier curves for PFS and OS after ASCT. The median OS after ASCT has not been reached, and the estimated 2-year PFS and OS are 57% (95% CI, 34-81%) and 83% (95% CI, 64-100%), respectively.

Univariable and multivariable analyses performed to identify prognostic factors for progression after transplantation included age ( $<$  and  $\geq 45$  years), sex, time from diagnosis to ASCT ( $<$  and  $\geq 29$  months), disease status at ASCT (CR vs. not in CR), number of

**Table 3. Outcome following ASCT.**

	Pre-ASCT n° (%)	After ASCT 3 months n° (%)	Last follow-up* n° (%)
Complete remission	13 (43)	24 (80)	20 (67) <sup>o</sup>
Partial remission	10 (33)	4 (13)	2 (7) <sup>o</sup>
Chemoresistant	5 (17)	-	-
Alive with progressive disease	-	-	5 <sup>#</sup>
Untreated relapse	2 (7)	-	-
Treatment-related death	-	1	1
Progression-related death	-	-	2 <sup>#</sup>
Patients not evaluated for response	-	1	-

\*Median of 19 (1-89) months; <sup>o</sup>median follow-up for patients in CR/PR: 17 (1-89) months; <sup>#</sup>median time to progression: 11 (6-22) months (one patient is in CR after cranial irradiation). ASCT: autologous stem cell transplant.

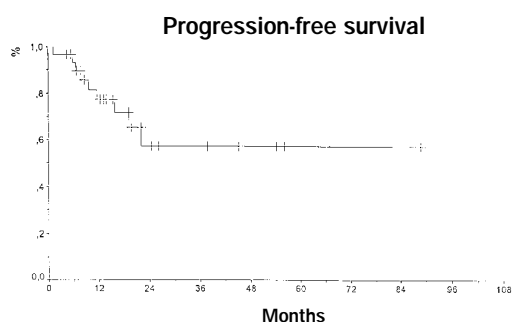


Figure 1. Progression-free survival.

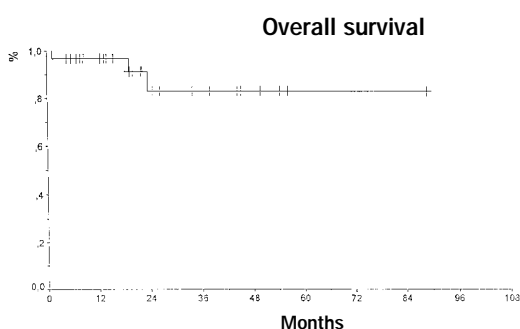


Figure 2. Overall survival.

have obtained response conversion and five are in CR but have not reached the conversion duration, while two patients had a shorter time PFI post-transplant than the pre-ASCT interval.

## Discussion

Our results confirm the high rate of responses obtained with ASCT for patients with advanced FL. Thus, three months post-transplant, 86% of the patients were in CR and 14% in PR, with improvement in response (PR to CR, or NR to PR/CR) in 14 cases. With a median follow-up of 19 months, 67% remain in CR and 7% in PR. Additionally, among 17 patients evaluable for remission conversion, 10 have had a conversion of the PFI after the transplant, while five are too early but remain in remission. The main handicap of our study is the relatively short follow-up after transplant. In most previous studies, despite high rates of response after transplant, a continuous rate of relapse/progression is subsequently observed.<sup>4-12</sup> Furthermore, there is no evidence that OS is prolonged, and ASCT may simply prolong PFS in absence of an impact on survival. Unfortunately, without controlled studies any modification in OS cannot be proven.

Our patients have an estimated 2-year PFS and OS of 57% and 83%, respectively. Previous studies which

included from 21 to 100 cases reported PFS of 53% to 75% at 2 years and 44% to 55% at 4 years, while the estimated OS rates ranged from 80% to 90% and 65% to 75%, respectively.<sup>4-14</sup> As stated, however, relapses continue to occur even more than 5 years after the procedure, and longer follow-up is needed to see whether a plateau in PFS occurs. One difficulty in comparing our results with those from other institutions is that the patient characteristics, stem cell sources, conditioning regimens and purging methods have varied markedly. For instance, while we attempted to include only patients with chemosensitive disease, others have autografted more chemoresistant cases, with shorter PFS and OS.<sup>9,13</sup> Even in chemosensitive patients, however, bad results have been reported; for instance, Verdonck *et al.* recently reported on 18 patients with chemosensitive FL who underwent an ASCT, and who had 2-year DFS and OS of 22% and 33%, respectively.<sup>20</sup>

Transplant-related mortality (TRM) was low in our experience, with there being only one such event, giving a rate similar to the currently accepted one of less than 5% in patients autografted for lymphoid malignancies.<sup>10</sup> Also important, we have not observed any late complications such as secondary myelodysplasia or AML, which have raised significant concern in other institutions.<sup>8,21-23</sup> However, the median time for developing these myeloid malignancies was 34 months (range 5-101) in those studies, and we may see such late complications in the future, especially when considering that most of our patients were heavily pre-treated before ASCT.

It is of the utmost importance to identify which patients are most likely to benefit from an ASCT, at least in terms of prolonged PFS. In our patients, none of the variables analyzed were predictive of progression after the procedure. This may be due to the fact that only eight progressions have occurred post-transplant, and that the numbers of patients in each group are small. In previous studies few factors predicting outcome have been consistently identified, although in two independent series the number of previous CT regimens correlated with the risk of

Table 4. Comparison of last PFI and post-ASCT PFI.

<i>Evaluable for conversion</i>	
PFI post-ASCT longer than last PFI before ASCT CR/PR but have not reached the conversion duration of response	10 pts 5 pts
PFI post-ASCT shorter than the last PFI before ASCT	2 pts
<i>Not evaluable for conversion</i>	
ASCT in first response	5 pts
Early TRM	1 pt
Primary refractory cases in CR/PR after ASCT	7 pts

PFI: Progression free interval. ASCT: Autologous stem cell transplant. TRM: Transplant related mortality.

relapse failure.<sup>8,9</sup> Investigators from the Dana-Farber Cancer Institute studied the influence of various clinical and biologic parameters on the duration of PFS and OS both in relapsed FL<sup>15</sup> and in high-risk patients in first remission.<sup>5</sup> In both situations, bcl-2 rearrangement negative BM studied by a sensitive PCR method and/or a persistent negativity of the patient's BM and peripheral blood by PCR post-transplant were associated with prolonged progression-free survival, while positive PCR post-transplant predicted relapse. The Turin Group reported their experience with molecular monitoring of minimal residual disease after ASCT in follicular and mantle cell lymphomas, and concluded that autografting with PCR-negative harvest is associated with durable clinical and molecular remissions.<sup>24</sup> Other investigators have not found this correlation between PCR-negativity of the infused stem cells or of the patients' BM or peripheral blood post-ASCT and the PFS,<sup>8,14,16</sup> suggesting that the inability to purge the stem cells or to obtain a PCR negative state after the procedure may be a surrogate marker for a more aggressive disease.<sup>25</sup> We did not look at this aspect in the current study and the role of bcl-2 status on the results of ASCT is now being prospectively evaluated at our institution.

In conclusion, in our experience ASCT for advanced FL obtains high rates of clinical responses and frequent remission inversions. Early TRM is low. Longer follow-up is necessary to identify any late complications, as well as to determine the rate of long-term PFS and OS. Better clinical and biologic prognostic factors for failure-free survival after ASCT, as well as refinements in PBSC harvesting and purging methods, should identify which patients with advanced FL are likely to benefit from an autograft, and alternatively which should proceed to other promising therapies under investigation such as allogeneic SCT<sup>20,26,27</sup> monoclonal antibody-targeted therapies or other experimental treatments.<sup>28,29</sup>

### Contributions and Acknowledgments

*RL designed the study, was responsible for data management and prepared the manuscript. RM performed the data analysis and participated in writing the paper. AS collaborated in patient care and data management. JS is the head of the Clinical Hematology Division and participated in writing the paper, JG is the head of Institut de Recerca Oncològica. JN, JB, GMH and SB collaborated in patient care and in preparation of the manuscript.*

### Funding

*This work was supported in part by a grant from Fundació Ramón Areces (JS 1997-1999) and by grant FIS 97/0626 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias del Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain.*

### Disclosures

*Conflict of interest: none.  
Redundant publications: no substantial overlapping with previous papers.*

### Manuscript processing

*Manuscript received September 21, 1998; accepted January 8, 1999.*

### References

1. Horning SJ, Rosenberg SA. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1984; 311:1471-5.
2. Gallagher CJ, Gregory WM, Jones AE, et al. Follicular lymphoma: prognostic factors for response and survival. *J Clin Oncol* 1986; 4:1470-80.
3. Johnson PWM, Rohatiner AZS, Whelan JS, et al. Patterns of survival in patients with recurrent follicular lymphoma: a 20-year study from a single center. *J Clin Oncol* 1995; 13:140-7.
4. Hass R, Moos M, Mühle R, et al. High-dose therapy with peripheral blood progenitor cell transplantation in low-grade non-Hodgkin's-lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17:149-55.
5. Freedman AS, Gribben JG, Neuberg D, et al. High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation in patients with follicular lymphoma during first remission. *Blood* 1996; 88:2780-6.
6. Morel P, Laporte JP, Noel MP, et al. Autologous bone marrow transplantation as consolidation therapy may prolong remission in newly diagnosed high-risk follicular lymphoma: A pilot study of 34 cases. *Leukemia* 1995; 9:576-82.
7. Bastion Y, Brice P, Haioun C, et al. Intensive therapy with peripheral blood progenitor cell transplantation in 60 patients with poor prognosis follicular lymphoma. *Blood* 1995; 86:3257-62.
8. Rohatiner AZS, Johnson PWM, Price CGA, et al. Myeloablative therapy with autologous bone marrow transplantation as consolidation therapy for recurrent follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 1994; 12:1177-84.
9. Bierman JP, Vose JM, Anderson JR, Bishop MR, Kessinger A, Armitage JO. High-dose therapy with autologous hematopoietic rescue for follicular low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1997; 15:445-50.
10. Horning SJ. High-dose therapy and transplantation for low-grade lymphoma. *Hematol Oncol Clin N Am* 1997; 11:919-35.
11. Horning SJ, Negrin RS, Hoppe RT, et al. High dose therapy and autografting for follicular low grade lymphoma in first remission: the Stanford experience [abstract]. *Blood* 1997; 90 (Suppl.1):594a.
12. Colombat Ph, Donadio D, Fouillard L, et al. Value of autologous bone marrow transplantation in follicular lymphoma: A France Autogreffe retrospective study of 42 patients. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13: 157-62.
13. Cervantes F, Shu XO, McGlavep, et al. Autologous marrow transplantation for non-transformed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16:387-92.
14. Bulabois CE, Milpied N, Mahe B, et al. Purged or unpurged autologous stem cell transplantation for 66 patients with follicular lymphomas: a single center experience [abstract]. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21 (Suppl 1):169.
15. Gribben JG, Neuberg D, Freedman AS, et al. Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl-2 translocation is associated with increased risk of relapse after autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *Blood* 1993; 81:3449-57.
16. Williams CD, Goldstone AH, Pearce RM, et al. Purging of bone marrow in autologous bone marrow trans-

- plantation for non-Hodgkin's lymphoma: a case-matched comparison with unpurged cases by the European Blood and Marrow Transplant Lymphoma Registry. *J Clin Oncol* 1996; 14:2454-64.
17. López R, Martino R, Sureda A, et al. Results of IAPVP-16 salvage chemotherapy for relapsed or primary refractory follicular and mantle-cell lymphomas [abstract]. *Blood* 1997; 90 (Suppl. 1):193a.
  18. Kvalheim G, Sorensen O, Fodstad O, et al. Immunomagnetic removal of B-lymphoma cells from human bone marrow: A procedure for clinical use. *Bone Marrow Transplant* 1988; 3:31-41.
  19. Martin-Henao GA, Picón M, Limón A, et al. Immunomagnetic bone marrow and peripheral blood progenitor cells purging in follicular lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1999; in press.
  20. Verdonck LF, Dekker AW, Lokhorst HM, Petersen EJ, Nieuwenhuis HK. Allogeneic versus autologous bone marrow transplantation for refractory and recurrent low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90:4201-5.
  21. Darrington DL, Vose JM, Anderson JR, et al. Incidence and characterization of secondary myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia following high-dose chemoradiotherapy and autologous stem cell transplantation for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol* 1994; 12:2527-34.
  22. Miller JS, Arthur DC, Litz CE, Neglia JP, Miller WJ, Weisdorf DJ. Myelodysplastic syndrome after autologous bone marrow transplantation: An additional late complication of curative cancer therapy. *Blood* 1994; 83:3780-6.
  23. Stone RM, Neuberger D, Soiffer R, et al. Myelodysplastic syndrome as a late complication following autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1994; 12:2535-42.
  24. Corradini P, Astolfi M, Cherasco C, et al. Molecular monitoring of minimal residual disease in follicular and mantle cell non-Hodgkin's lymphomas treated with high-dose chemotherapy and peripheral blood progenitor cell autografting. *Blood* 1997; 89:724-31.
  25. Freedman AS, Gribben JG, Nadler LM. High dose therapy and autologous stem cell transplantation in follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1998; 28:219-30.
  26. van Besien KW, Rowlings PA, Sobocinski KA, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for low grade lymphoma [abstract]. *Blood* 1995; 86 (Suppl.1): 209a.
  27. Martínez C, Martino R, Brunet S, et al. Allogeneic stem cell transplantation for advanced low-grade lymphoproliferative disorders: report of six cases. *Haematologica* 1996; 81:330-4.
  28. Piro L, White CA, Grillo-López AJ, et al. RITUXAN™ (rituximab, IDEC-C2D8): interim analysis of a phase II study of once weekly times 8 dosing in patients with relapsed low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma [abstract]. *Blood* 1997; 90 (Suppl. 1):510a.
  29. Hsu F, Benike C, Fagnoni F, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen pulsed dendritic cells. *Nature Med* 1996; 2:52-8.

#### **5.4. Otras publicaciones relacionadas con esta tesis**

---

## CORRESPONDENCE

---

### Autologous or Allogeneic Stem Cell Transplantation in Advanced Low-Grade Lymphomas?

To the Editor:

In the November 15, 1997 issue of *Blood*, Verdonck et al<sup>1</sup> reported their results with autologous and allogeneic bone marrow transplantation (BMT) in patients with refractory or recurrent low-grade non-Hodgkin's lymphoma. Their experience deserves several comments, because, in our opinion, the investigators describe an unrealistically good outcome after allotransplantation and nonrepresentative poor results in autologous recipients.

Ten patients received an allogeneic BMT in their series. Despite the fact that 7 of them had chemotherapy-resistant disease, all allografted patients achieved a complete remission after the procedure. In addition, there were no relapses at a median follow-up of 41 months. Transplant-related mortality occurred in 3 patients, which is a relatively low rate for a series with a median age of 43 years. To our knowledge, only one other series has reproduced such impressive results after allogeneic transplantation for follicular lymphoma.<sup>2</sup> In that study, the MD Anderson team reported 8 survivors in a series of 10 patients with advanced chemoresistant disease.<sup>2</sup> In contrast, most BMT groups have less encouraging experience in this setting. A recent report from the IBMTR<sup>3</sup> has summarized the results obtained in 81 patients who received an allograft for poor-risk low-grade lymphoma. It is noteworthy that the 3-year relapse rate was 24% and the transplant-related mortality was 44%. These findings translated into a 43% disease-free survival and a 46% overall survival. These data probably appear more realistic to many physicians involved in this field, ie, advanced low-grade lymphomas do relapse after allogeneic transplant and treatment-related mortality is considerable, at least as high as seen in other situations in groups of patients of comparable age. However, the report of Verdonck et al<sup>1</sup> provides further support for the continuing clinical research in the application of allogeneic stem cell transplantation for the management of low-grade lymphoproliferative disorders.

On the other hand, the results of the study of Verdonck et al<sup>1</sup> with autologous BMT are unreasonably poor. In their group of 18 patients, all with advanced but chemosensitive disease, the 2-year progression-free survival was only 22% and the probability of relapse was as high as 83%. Fifteen of the 18 patients relapsed, despite the fact that, in all instances, the procedure was performed as treatment for chemosensitive disease. More specifically, 11 of 12 patients autografted in partial remission relapsed, in addition to 4 of 6 patients in complete remission before transplantation. This relapse rate is much higher than that reported by other studies<sup>1,4-8</sup> and compares unfavorably with our own results.<sup>5</sup> At our institution, we have autografted 27 patients (median age, 46 years) suffering from relapsed or primary refractory low-grade lymphoma. After a median follow-up of 16 months, 6 patients have progressed between 6 and 19 months posttransplantation. The estimated 2-year progression-free survival is 67%.<sup>5</sup> Our results are similar to those of previous reports showing disease-free survival rates of 53% to 76% at 2 years and 43% to 59% at 4 years.<sup>4-8</sup> Treatment-related mortality after autotransplantation is usually low, usually less than 10% (4% in our series). To justify the discrepancies observed, a shorter follow-up of our patients compared with those of the series of Verdonck et al<sup>1</sup> could be argued. However, in their report, 14 of the 15 relapses were observed in the first 16 months after autograft, the median follow-up time of our series.

We recognize that autologous transplantation is associated

with a continuous rate of relapse and with the development of secondary myelodysplasia.<sup>4</sup> However, we feel that this procedure offers a better perspective than that reflected in the report by Verdonck et al.<sup>1</sup> Allogeneic transplantation merits further research. The short-term risks of this procedure have to be seriously taken into account, and despite a likely graft-versus-lymphoma effect, disease recurrence remains a problem in a significant proportion of patients.

Rosario López  
Rodrigo Martino  
Salut Brunet  
Jorge Sierra  
*Clinical Hematology Division  
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau  
Barcelona, Spain*

#### REFERENCES

1. Verdonck LF, Dekker AW, Lokhorst HM, Petersen EJ, Nieuwenhuis HK: Allogeneic versus autologous bone marrow transplantation for refractory and recurrent low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90:4201, 1997
2. van Besien KW, Khouri IF, Giralt SA, McCarthy P, Mehra R, Andersson BS, Przepiorka D, Gajewski JL, Bellare N, Nath R, Romaguera JF, McLaughlin P, Korbling M, Deisseroth AB, Cabanillas F, Champlin RE: Allogeneic bone marrow transplantation for refractory and recurrent low-grade lymphoma: The case for aggressive management. *J Clin Oncol* 13:1096, 1995
3. van Besien KW, Rowlings PA, Sobocinski KA, Philips G, Vose J, McCarthy P, Klein JP, Champlin R, Horowitz MM: Allogeneic bone marrow transplantation for low grade lymphoma. *Blood* 86:209a, 1995 (abstr, suppl 1)
4. Horning SJ: High-dose therapy and transplantation for low-grade lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 11:919, 1997
5. López R, Martino R, Sureda A, Muñoz L, Domingo-Albós A, Brunet S: Stem cell transplantation in advanced follicular and mantle-cell lymphomas. *Blood* 90:404b, 1997 (abstr, suppl 1)
6. Gribben JG, Neuberger D, Freedman AS, Gimmi CD, Pesek KW, Barber M, Saporito L, Woo SD, Coral F, Spector N, Rabinow SN, Grossbard ML, Ritz J, Nadler LM: Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl-2 translocation is associated with increased risk of relapse after autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *Blood* 81:3449, 1993
7. Bastion Y, Brice P, Haioun C, Sonet A, Salles G, Marolleau JP, Espinouse D, Reyes F, Gisselbrecht C, Coiffier B: Intensive therapy with peripheral blood progenitor cell transplantation in 60 patients with poor prognosis follicular lymphoma. *Blood* 86:3257, 1995
8. Rohatiner AZS, Johnson PWM, Price CGA, Arnott SJ, Amess JAL, Norton AJ, Dorey E, Adams K, Whelan JS, Matthews J, MacCallum PK, Oza AM, Lister TA: Myeloablative therapy with autologous bone marrow transplantation as consolidation therapy for recurrent follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 12:1177, 1994



## Immunomagnetic bone marrow (BM) and peripheral blood progenitor cell (PBPC) purging in follicular lymphoma (FL)

GA Martín-Henao<sup>1</sup>, M Picón<sup>1</sup>, A Limón<sup>1</sup>, M Carmona<sup>1</sup>, B Amill<sup>1</sup>, C Azqueta<sup>1</sup>, R López<sup>2</sup>, E González-Barca<sup>3</sup>, A Grañena<sup>3</sup> and S Brunet<sup>2</sup> and J García<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cryobiology and Cell Therapy, Cancer Research Institute, Clinical Hematology Division, <sup>2</sup>Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and <sup>3</sup>Hospital Durán i Reynals, Barcelona, Spain

### Summary:

Twenty-nine B cell follicular lymphoma (FL) patients had their BM ( $n = 12$ ) or PBPC ( $n = 17$ ) purged using a panel of monoclonal antibodies and immunomagnetic beads (IMB). The median recovery of nucleated cells (NC) and CD34<sup>+</sup> cells was 59.3% (40.5–74) and 56.1% (30.8–82.9) in BM and 77.2% (64.7–88.3) and 73.5% (61.5–98.6) in PBPC ( $P < 0.0005$ ). A median of  $>1.62$  and  $>1.02$  log of target cell depletion was achieved as judged by flow cytometry analysis in BM and PBPC, respectively. Of 29% of initial harvests that had a bcl2 PCR-amplified signal, 37.5% became PCR negative in the final purged products. Adsorbed cells containing IMB–target cell complexes gave bcl2 rearrangement signal in 20% of samples in which the start and final purged components were negative. Twenty-three of 26 patients receiving an autologous purged product are evaluable for engraftment. Median time to reach an ANC  $> 0.5 \times 10^9/l$  and platelet count  $>20 \times 10^9/l$  was 21 (11–43) and 41 days (13–70) for BM ( $n = 9$ ) and 14 (10–31) and 14 (8–37) for PBPC ( $n = 14$ ) autografted patients ( $P = 0.01$  and  $0.001$ ). One patient did not engraft and was rescued with a back-up BM. These data demonstrate that this indirect immunomagnetic technique is able to achieve a high grade of lymphoma cell depletion in BM and PBPC and that these purged products are capable of rapid engraftment after autologous transplantation.

**Keywords:** immunomagnetic purging; follicular lymphoma

High-dose myeloablative therapy with autologous hematopoietic progenitor cell rescue is being used with increasing frequency to treat patients with follicular lymphomas (FL) who fail to achieve a complete remission (CR) or relapse after conventional therapies or in poor-risk patients in first CR.<sup>1–3</sup> However, the main problem of this approach is the high percentage of relapses after transplantation.<sup>4</sup> BM involvement is common in FL at diagnosis and relapse.<sup>5</sup>

Additionally, by applying sensitive detection techniques, lymphoma cells can be detected in histologically normal BM grafts in 20–70% of patients after high-dose therapy as well as in PBPC after mobilization.<sup>6–10</sup> The contribution of these graft contaminating malignant cells to relapse after transplantation remains controversial. Nevertheless, gene-marking studies of autografted cells have shown that tumor cells remaining in the graft contribute to relapse.<sup>11,12</sup> Another indirect line of evidence has been reported by Sharp *et al*<sup>13</sup> in lymphoma patients who had their marrows studied *in vitro* utilizing a tumor cell culture method. Those patients in whom lymphoma cells could be detected had a poorer survival than patients autografted with marrow in which tumor cells could not be grown in culture. Another report from the Dana-Faber Cancer Institute in patients with FLs has shown that efficient BM purging, evaluated by a PCR technique, improved the disease-free survival.<sup>14</sup> Consequently, a number of attempts have been made to treat the graft *ex vivo* with a variety of methods including chemotherapeutic or immunological agents.<sup>15–24</sup>

Monoclonal antibodies (MoAb) can be used in different ways; one of them is the immunomagnetic technique where a combination with iron-containing polymer beads coated with a secondary polyclonal Ab is used. Afterwards, immunomagnetic beads (IMB)–target cell complexes can be separated by exposing the cell suspension to a magnetic field. This method has been used to purge grafts from patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL),<sup>17</sup> neuroblastoma,<sup>18</sup> non-Hodgkin's lymphomas,<sup>19</sup> multiple myeloma<sup>20</sup> and some non-hematological tumors.<sup>21</sup>

In this work, we report our experience on purging of lymphoma cells from BM and PBPC, using a panel of MoAb and IMB following a technique first developed by Kvalheim *et al*.<sup>22,23</sup> The main parameters analyzed were effectiveness of lymphoma cell purging, nucleated and progenitor cell recovery and hematopoietic engraftment after autologous transplantation, comparing BM and PBPC.

### Patients and methods

#### Patients

Twenty-nine patients with FL were enrolled in this study from June 1994 until February 1998. Thirteen were female and 16 male with a median age of 43 years (range 19–57). Until October 1995 purging was performed on BM

Correspondence: Dr GA Martín-Henao, Department of Cryobiology and Cell Therapy, Cancer Research Institute, Hospital Duran i Reynals, Avda Castelldefels Km 2,7, L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain  
Received 3 August 1998; accepted 20 October 1998

harvests. Subsequently, PBPC harvests were used unless the initial cellularity was insufficient for purging. Twelve patients were eligible for BM and 17 for PBPC purging. BM biopsies and aspirations were performed at the time of evaluation and before purging. Only patients with less than 20% B lymphocyte BM infiltration after induction or salvage therapy were eligible for purging. Before purging, nine patients had detectable B cells (median 5%, range 3–20) in BM aspirates. The *bcl2*/*IgH* rearrangement status of the BM samples was known in 10 patients at diagnosis or at the time of evaluation and nine of them were positive. Nineteen patients were in first or subsequent CR, nine in partial remission (PR) and one in relapse.

#### *BM and PBPC harvest and immunomagnetic purging*

**BM:** At least  $2 \times 10^8$ /kg body weight nucleated cells (NC) were collected in BM harvests. BM purging was performed according to an indirect immunomagnetic method previously described by Kvalheim *et al*<sup>22</sup> with some modifications. The working buffer used consisted of 0.9% sodium chloride (Baxter, Deerfield, IL, USA) containing 1% (w/v) human serum albumin (HSA, Grifols, Barcelona, Spain) and 1% (v/v) sodium bicarbonate (Pharmacia Iberica, Spain). Light-density mononuclear cells (LDCs) were isolated using Ficoll–Hypaque (1.077 g/ml; Pharmacia, Uppsala, Sweden) in a Cobe 2991 cell processor (Cobe BCT, Lakewood, CO, USA).<sup>25</sup> When the cellularity obtained after Ficoll isolation was higher than  $4 \times 10^7$  LDCs/kg body weight, a fraction of  $1 \times 10^7$  LDCs/kg was cryopreserved as a back-up. LDCs were incubated at a concentration of  $2\text{--}3 \times 10^7$  cells/ml with a pool of GMP clinical grade B cell Ab (CD19, CD20, CD22, CD23 and CD37, Baxter Europe, Unterschleissheim, Germany), 1 mg of each, at 4°C for 30 min with gentle shaking. Cells were washed twice and resuspended to a final concentration of approximately  $5 \times 10^7$  cells/ml in a Lifecell bag (Baxter). A sample was taken out to calculate the percentage of target cells. Cells were incubated for two rounds with previously washed IMB coated with sheep antimouse immunoglobulin (SAM-IMB, Dynabeads M-450; Dynal, Oslo, Norway) to give a SAM-IMB/target cell ratio of 20:1, which had been found to be optimal in preclinical experiments (data not shown). The cell suspension was incubated at 4°C for 30 min with gentle shaking. Separation of IMB–target cell complexes was performed by using the MaxSep Magnetic Cell Separator (Baxter) according to the manufacturer's instructions.

**PBPC:** PBPC were collected after different chemotherapy mobilization regimens (IAPVP-16: ifosfamide 5 g/m<sup>2</sup> i.v. day 1, VP-16 100 mg/m<sup>2</sup> i.v. days 1–3, Ara-C 1.2 g/m<sup>2</sup>/12 h i.v. days 1–2, methylprednisolone 80 mg/m<sup>2</sup> i.v. days 1–5 ( $n = 7$ ) or cyclophosphamide 1.5 g/m<sup>2</sup> day 1 i.v. ( $n = 10$ )) followed by recombinant human G-CSF, administered s.c. at a daily dose of 5–10 µg/kg/day starting the day after the completion of chemotherapy. Leukapheresis (LK) was initiated at a CD34<sup>+</sup> cell count  $>2.5 \times 10^6$ /l. All collections were performed using the COBE Spectra (COBE) or CS3000 (Fenwal, Baxter Healthcare). LK were performed daily until adequate numbers of CD34<sup>+</sup> cells were collected

for both unpurged back-up ( $2 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> cells/kg) and for 'ex vivo' treatment (at least  $4 \times 10^6$ /kg). The purging protocol was done following the manufacturer's recommendations (Baxter Healthcare). The working buffer used throughout the purging procedure consisted of Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>-free PBS (Braun, Boulogne, France) with 1% HSA (Grifols) and 5% (v/v) sodium citrate (Baxter Healthcare). LK products were washed to remove platelets, incubated with 0.1% (w/v) human Ig (Grifols) and resuspended in medium to give an approximate cell concentration of  $1 \times 10^8$  cells/ml. The cells were then incubated with the pool of Ab (1 mg of each, 15 min, RT, with gentle shaking) and washed twice to remove excess Ab. All of these steps were performed in the Cobe 2991 cell processor (Cobe BCT). Afterwards, cells were transferred to a Lifecell bag (Baxter) and adjusted with buffer to a final cell concentration of approximately  $1 \times 10^8$  cells/ml. The cells were incubated for two rounds with IMB at a ratio of 0.7 IMB per NC at 4°C for 30 min with gentle shaking. Separation of IMB–target cell complexes was performed with the MaxSep device (Baxter).

The different purging protocols applied on BM and PBPC were based on the different cellular composition between both sources of progenitors and no obvious influence on the purging results was noted.

Cell viability was evaluated by Trypan Blue dye exclusion in fresh and purged products. All cell counts during the procedure were obtained using a Coulter JT3 counter (Coulter Electronic, Hialeah, FL, USA).

#### *Monoclonal Ab*

The following GMP clinical grade Ab were used in this study: HD237 (IgG2b<sub>k</sub>, with specificity for CD19), L-3b3<sub>k</sub> (IgG1, anti-CD20), HD239 (IgG2b<sub>k</sub>, anti-CD22), HD50 (IgG2b<sub>k</sub>, anti-CD23) and HD28 (IgG2a<sub>k</sub>, anti-CD37). These Ab were purchased by Baxter (Baxter Europe, Unterschleissheim, Germany). In 9/29 pool of four MoAb was used for transient supply problems.

#### *Cytometry analysis*

A sample of BM-LDCs or LK was taken out before purging and after the first and second round of incubation. The PE-CD34 (HPCA-2; IgG1, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) was used to assess the percentage of CD34-positive cells pre- and post-purging. Indirect immunofluorescence studies were performed to assess the percentage of target cells at each step during the treatment. Cell samples ( $5 \times 10^5$  cells) with surface-bound primary MoAb (those used for the immunomagnetic purging) were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC) goat-anti-mouse polyclonal Ab (Gam-FITC; Dako, Glostrup, Denmark). Double staining with PE-CD34 and Gam-FITC was performed before and after purging to assess the percentage of CD34<sup>+</sup> cells that co-expressed target-positive cells. Markers of cell viability, propidium iodide (IP; Sigma Chemical, Saint Louis, MO, USA) or 7-aminoactinomycin-D (7-AAD; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) were also included. Cells incubated with the nonbinding isotype Ab were used as controls to define the nonlabeled population. Erythrocytes



were lysed from a sample using ammonium chloride lysis. A gate identifying CD34<sup>+</sup> cells was drawn in a dual-parameter cytogram of side scatter (SS) and fluorescence after excluding dead cells. Similarly, positive events with lymphoid morphology (as defined by SS) above the negative control were considered as target-positive cells. FS, SS (linear amplification) and fluorescence signals (logarithmic amplification) were determined for each cell and stored in list mode data files. Flow cytometry was performed on an Epics-XL-MCL cytometer (Coulter Electronic) equipped with 488 nm excitation argon laser.

#### *Clonogenic assays*

Clonogenic assays were performed in the LDCs-BM and PBPC cells before and after purging. For patients enrolled before 1997, cells were cultured in 0.9% methylcellulose (Sigma, Renfrewshire, UK) in IMDM (Gibco, Life Technologies, Paisley, UK) supplemented with 30% FBS (Gibco, Life Technologies), 1% deionized BSA (Sigma Chemical) with 2 mM L-glutamine, 2-ME (Merk) 10<sup>-4</sup> M, 2 U/ml of rh-erythropoietin (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 100 ng/ml of rh-GM-CSF (Boehringer Mannheim) and 10 ng/ml of rh-IL-3 (Sandoz, Vienna, Austria). After 1997, a commercially prepared methylcellulose-based medium with rh-SCF, rh-IL-3, rh-GM-CSF and rh-erythropoietin (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) was used. Assays were run in triplicate. Cells were plated at 10<sup>5</sup> cells/ml. Cultures were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Colonies were enumerated using an inverted microscope after 12–14 days of culture.

#### *DNA preparation and PCR amplification*

DNA was isolated by classical techniques (proteinase-K digestion and phenol chloroform extraction).<sup>26</sup> For samples attached to IMB a magnetic field was applied before phenol extraction in order to remove the beads. PCR amplification of the t(14;18) bcl-2/IgH rearrangement was undertaken in the presence of 1 μg of genomic DNA, 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 16.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% Tween-20, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 25 pmol oligonucleotide primers specific for the MBR region of the bcl2 gene (5'-CCTTTA-GAGAGTTGCTTTACGTG-3') and the JH segments of the IgH gene (5'-ACCTGAGGAGACGGTGACC-3')<sup>27</sup> and 1 U Taq polymerase (DNA-Polymerase-C; Bio 101, La Jolla, CA, USA) in a total volume of 50 μl. Amplification was performed for 35 cycles on a Hybaid (Teddington, Middlesex, UK) apparatus with the following protocol: 1 min at 94°C, 1 min at 65°C and 1 min at 72°C increased to 10 min in the last cycle. To ensure that DNA could be amplified in all samples, a 172 bp fragment of the unrearranged bcl2 gene was amplified using the 5'-GGAGGTCTGGCTTCATAC-3' primer and the MBR primer specified above, under the same conditions. 10 μl of PCR amplified products were separated on a 1.5% agarose gel, transferred to a nylon membrane (Hybond-N; Amersham, Buckinghamshire, UK) and hybridized with an internal <sup>32</sup>P-bcl2 probe (5'-GGCCTGTTTCAACACAGACCC-3') labeled with T4 polynucleotide kinase (Pharmacia) according to the manufacturer's instructions.

The sensitivity of the analysis was estimated by concurrent amplification of log dilutions of Karpas 422 cells (a bcl-2/IgH rearranged cell line obtained from the ATCC) in normal cells (buffy coat cells from healthy donors) which proved to be 10<sup>-6</sup>.

#### *Purging efficiency*

The specific cell depletion yield was determined using the following formula: depletion [log] = log<sub>10</sub> (total positive cells pre-purging/total positive cells post-purging). Total positive cells were obtained by multiplying the percentage of lymphoid-GamFITC-positive cells by the cell count and volume of the specimen.

Purging efficiency was monitored by determining the reduction in the total number of target antigen-positive cells, including normal B and lymphoma cells. In addition, using an established cell line, the limit for sensitivity detection of cells by flow cytometry was set at 0.1%. When positive cells were not detectable in the final product, the target cell contamination was considered to be less than 0.1%.

Nonspecific cell loss was calculated by the difference between cell loss shown during the purging procedure and cell loss due to specific (target) cell removal.

#### *Cryopreservation, storage and infusion*

Purged LDCs-BM or PBPC were concentrated by centrifugation and resuspended in 50 ml of PBS. An equal volume of cryopreservation solution consisting of 20% dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma Chemical, Irvine, UK) and 8% HSA in PBS was added to achieve a final DMSO and HSA of 10% and 4%, respectively. Cells were then cooled in a programmed freezer following standard procedures and stored in liquid N<sub>2</sub> until reinfusion. Unpurged LDCs-BM or PBPC saved as back-up were cryopreserved in autologous plasma and DMSO (10%) and stored in the same conditions. On the day of infusion, bags were thawed in a 37°C water bath. Bag contents were aspirated into 60 ml syringes and injected through a central venous catheter. A sample was obtained after thawing for cell counts and hematopoietic progenitor cell culture.

#### *Conditioning regimen*

All patients received cyclophosphamide (60 mg/kg i.v. 2 consecutive days) plus hyperfractionated TBI (2–2.5 Gy per fraction, twice daily on 3 consecutive days), as the conditioning regimen.

#### *Statistical analysis*

Data are shown as median and range. Statistical analysis in SPSS 7.5 software was performed using the Wilcoxon rank test and Spearman coefficient correlation. Time-dependent variables were compared between the two groups using the log rank test. A *P* value lower than 0.05 was considered significant.

## Results

### BM and PBPC processing

Results of the purging procedures are shown in Table 1.

**BM:** A median of  $3.35 \times 10^8$  NC/kg were harvested (range 1.8–6.2). After density gradient centrifugation, the median number of NC/kg body weight was of  $0.68 \times 10^8$  (range 0.24–1.48) with a yield of 17.4% (6.3–42). In 6/12 patients, a fraction of LDCs representing  $0.1 \times 10^8$ /kg was set aside and cryopreserved as back-up. The remaining six patients had a back-up of PBPC or BM prior purging or were harvested before transplant.

After the first cycle of purging a median of  $0.32 \times 10^8$ /kg NC (range 0.12–0.97) was recovered (yield of 68.2%; range 51.1–87.4). Nonspecific cell losses ranged from 0 to 40.3% (median 28.2%) and this occurred mostly during the first IMB cycle (median 19.6%). Cell viability pre- and post-purging was of 99% (range 95–99) and 97% (range 90–98).

**PBPC:** A median of two LK per patient (range 1–4) was performed. A cellular fraction of  $2 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg was taken out and cryopreserved as back-up in all patients. The numbers of LK needed to complete the whole procedure were: one (five patients), two (six patients) and three or more (six patients). The recovery of NC after the first cycle of purging was 81% (range 68.5–91.4). Nonspecific cell loss was 19% (2.8–35.1), most of this during the first cycle of separation (median 16.4%). Cell viability before and after purging was 98% (range 90–99) and 97% (range 89–99).

In the final purged BM and PBPC products a correlation was found between CD34<sup>+</sup> cells/kg and CFU-GM/kg ( $r = -0.85$ ,  $P < 0.0005$ ).

### Purging efficiency by flow cytometry

**BM vs PBPC:** Purging efficiency as determined by the reduction in the total number of target antigen-positive cells measured by flow cytometry was  $>1.62$  log (0.96– $>2.67$ ) on BM and  $>1.02$  log (0.14– $>1.6$ ) on PBPC ( $P = 0.001$ ).

**One vs two cycles:** The log of target cell depletion (for both BM and PBPC) was  $>1.04$  (0.15– $>2.21$ ) and  $>1.18$  (0.14– $>2.67$ ) after the first and second course of immunomagnetic purging, respectively ( $P = 0.001$ ).

**Four vs five MoAb:** In nine cases, all of them from PBPC, four instead of five MoAb were used. The log of target cell depletion in PBPC tended to be higher with the use of five (eight cases) vs four (nine cases) MoAb:  $>1.03$  (0.14– $>1.6$ ) vs  $>0.75$  (0.28– $>1.18$ ), respectively, although the differences were not significant.

### Purging efficiency by PCR detectable lymphoma cells

All purging procedures were assessed for bcl-2 translocation by PCR in the initial, in the first cycle absorbed (positive) and in the final (negative) cellular fraction. Results are shown in Figure 1. Eighty-three of 87 samples were evaluable for PCR in all the above mentioned fractions. Two out of 12 patients (16.6%) and 6/16 (37.5%) were PCR positive in BM and PBPC harvests, respectively. Therefore, 28.5% of fresh samples had a PCR-amplified signal. In the final purged products, no PCR signal could be detected in 22/27 (81.4%) evaluable samples. PCR performed in the first-cycle cellular fraction containing IMB-target cell complexes resulted in PCR+ products in 12/28 samples (42.8%). With the use of four MoAb, from 5/9 samples that were PCR+ in the initial and/or absorbed

**Table 1** Processing results

	BM (n = 12) <sup>a</sup>	PBPC (n = 17)	P
Initial cellular fraction			
NC/kg ( $10^8$ )	0.68 (0.24–1.48)	5.8 (2.4–10.2)	—
CD34/kg ( $10^6$ )	1.3 (0.27–4.3)	8.8 (3.9–26.3)	<0.0005
CFU-GM/kg ( $10^5$ )	NA	7.4 (0.6–27.0)	—
CD34 (%)	2.7 (1–7.5)	1.4 (0.65–4.1)	—
Target cells (%)	3.2 (1–20.7)	0.91 (<0.1–3.2)	<0.0005
CD34/target cells (%) <sup>b</sup>	31.4 (2.7–64.8)	0.1 (0.0–1.4)	<0.0005
Purged cellular fraction after second cycle			
NC/kg ( $10^8$ )	0.3 (0.11–1.1)	4.3 (1.8–7.4)	—
CD34/kg ( $10^6$ )	0.78 (0.12–2.74)	6.5 (3.4–16.4)	<0.0005
CFU-GM/kg ( $10^5$ )	0.27 (0.01–2)	7.5 (1.2–15.6)	<0.0005
CD34 (%)	2.2 (0.7–8)	1.26 (0.69–3.6)	—
Target cells (%)	0.1 (<0.1–0.9)	<0.1 (<0.1–0.6)	NS
CD34/target cells (%) <sup>b</sup>	2.2 (<0.1–6.1)	<0.1 (0.0–0.6)	0.01
Global results			
Yield NC (%)	59.3 (40.5–74)	77.2 (64.7–88.3)	<0.0005
Yield CD34 (%)	56.1 (30.8–82.9)	73.5 (61.5–98.6)	0.001
Yield CFU-GM (%)	NA	72.3 (11.5–343)	—
Log	>1.62 (0.96– $>2.67$ )	>1.02 (0.14– $>1.6$ )	0.001

<sup>a</sup>Initial cellular fraction on BM are light-density cells.

<sup>b</sup>Percentage of CD34<sup>+</sup> cells that co-express antigen-positive target cells. Data are shown in median and range.

NC = nucleated cells; Log = depletion logarithm;

NA = not available.

UPN	Source	Start	Absorbed	Final
314	BM	○	○	○
315	BM	○	○	○
319	BM	○	○	○
321	BM	●	●	●
322	BM	○	○	○
327	BM	○	○	○
332	BM	○	○	○
339	BM	●	●	●
345	BM	○	○	○
363	BM	○	○	○
365	BM	○	●	○
378	BM	○	○	*
326	PBPC	○	○	○
394	PBPC	○	○	○
454	PBPC	○	●	○
467	PBPC	●	●	●
546	PBPC	○	○	○
561	PBPC	●	●	○
592	PBPC	○	○	○
596	PBPC	○	○	○
608	PBPC	○	○	○
619	PBPC	○	●	○
622	PBPC	○	●	○
628	PBPC	●	●	●
611	PBPC	●	●	●
640	PBPC	●	●	○
691	PBPC	●	●	○
714	PBPC	○	○	○

● = Positive  
○ = Negative  
\* = Non-evaluable

**Figure 1** Lymphoma cell detection by molecular analysis. Bcl2/IgH rearrangement in the start (initial) adsorbed (positive) and final (purged) cellular fractions.

cellular fraction, three became PCR negative in the final product. In four cases five MoAb were used and gave PCR+ results in the initial and/or adsorbed cellular fraction; three became PCR negative in the final purged product. We next analyzed whether the ability to purge BM or PBPC of bcl2/IgH detectable cells by PCR correlated with the patients' clinical characteristics. Higher frequencies of PCR+ harvests were found in patients in PR or relapse vs CR (40 vs 22.2%), and in those with histological BM infiltration (33.3 vs 26.3%), although without significant differences. In the same way, patients in CR or those without BM infiltration by histology at purging had a higher percentage of PCR-negative purged products (88.2 vs 70% and 84.2 vs 75%), although again it did not reach statistical significance. Similarly, a higher frequency of PCR+ samples was found in the adsorbed-cellular fraction in CR vs PR or relapsed patients (44.4 vs 40%,  $P = NS$ ) and in those without BM infiltration (47.4 vs 33.3%,  $P = NS$ ).

**Table 2** Hematological recovery

	BM	PBPC	P
<i>n</i>	9	14	
ANC $>0.5 \times 10^9/l$	21 (11–43)	14 (10–31)	0.01
Platelets $>20 \times 10^9/l$	41 (13–70)	14 (8–37)	0.001

Median and range.

**Thawing and infusion**

Median yield of NC and CFU-GM after thawing was 87.9% (68.6–104.7) and CFU-GM 87.7% (46–104.2) for BM and 90.8% (43.4–127) and 26.6% (11–156) for PBPC, respectively. The low recovery of CFU-GM in PBPC seems to us to be a consequence of our previous clonogenic assay protocols. Cell viability was 92% (43–99) and 77% (40–91) for BM and PBPC purged products, respectively.

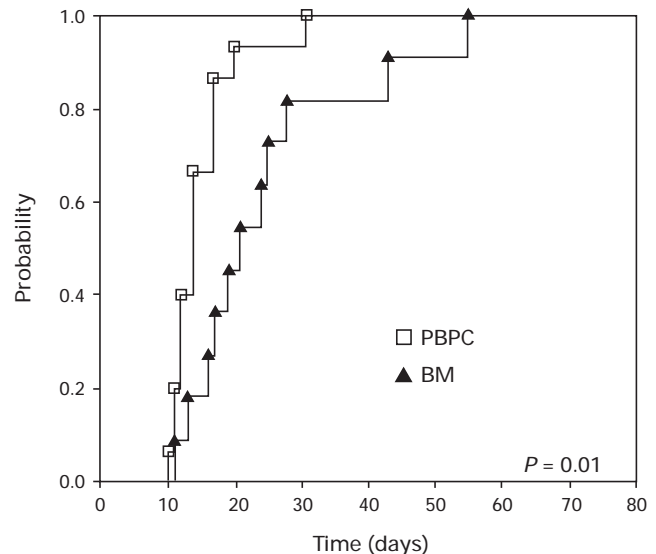
**Engraftment**

To date, 26 patients have been transplanted (11 BM and 15 PBPC) with these purged products. One patient did not engraft and was rescued with back-up marrow. That patient developed a myelodysplastic syndrome 2 years after transplant. There were two deaths, one on day 23 from ABMT with no signs of platelet engraftment and the other on day 16 from PBPC infusion. Those patients were not evaluable for engraftment.

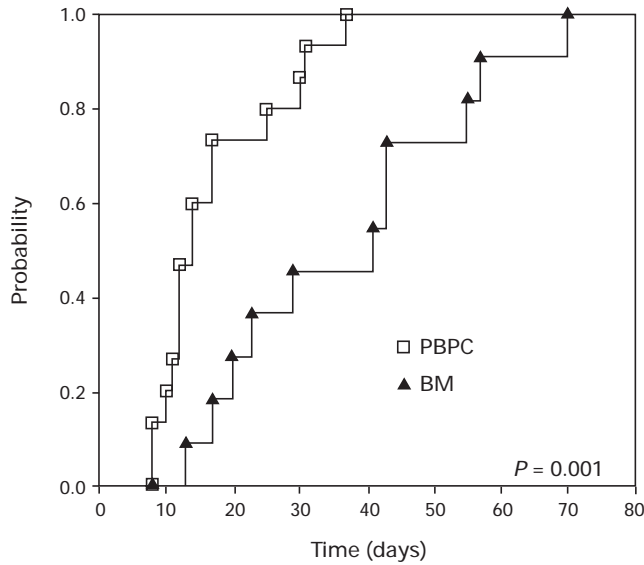
The median number of NC/kg and CD34+ cells/kg infused were  $2.7 \times 10^7/kg$  (1.1–11.0) and  $0.66 \times 10^6/kg$  (0.12–2.7) for BM and  $4.0 \times 10^8/kg$  (1.8–7.4) and  $6.3 \times 10^6/kg$  (3.8–16.4) for PBPC (cell number cryopreservation).

Data for hematological engraftment are shown in Table 2.

Recipients of autologous PBPC had a faster ANC  $>0.5 \times 10^9/l$  recovery (median 14 days; 95% confidence interval (CI) = 12.16) than recipients of autologous BM (median 21 days; (13.29)) as shown in Figure 2 ( $P = 0.01$ ).

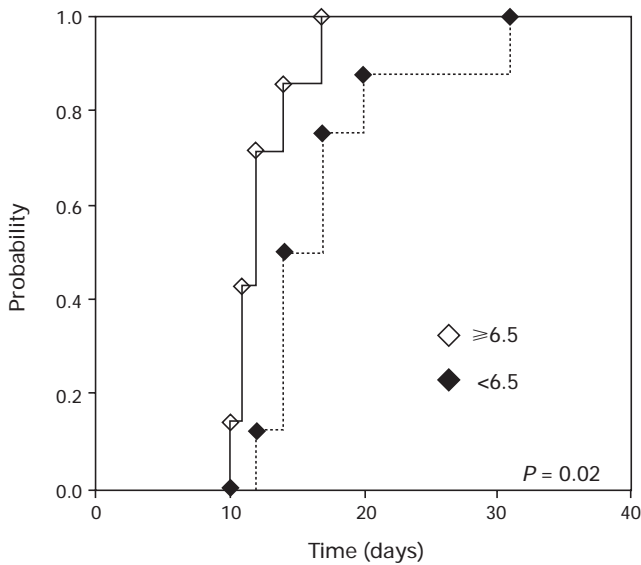


**Figure 2** Time to achieve granulocyte  $>0.5 \times 10^9/l$  after BM or PBPC transplantation ( $P = 0.01$ ).



**Figure 3** Time to achieve platelets  $>20 \times 10^9/l$  after BM or PBPC transplantation ( $P = 0.001$ ).

Similarly, platelet recovery was significantly faster with PBPC (median 14 days; (12.16)) than with BM transplants (median 41 days; (25.57)) as shown in Figure 3 ( $P = 0.001$ ). For autologous PBPC transplants, there was a negative correlation between the number of  $CD34^+$  cells/kg infused and the days to neutrophil recovery ( $r = -0.59$ ,  $P = 0.02$ ). Those patients receiving a median of  $7.3 \times 10^6$  (range 6.5–16.4)  $CD34^+$  cells/kg ( $n = 7$ ) had a median time to granulocyte engraftment of 12 days (11.13) (range 10–17) as opposed to 14 days (11.17) (range 12–31) for those patients transplanted with  $4.3 \times 10^6$  (range 3.8–6.2) ( $n = 8$ ) ( $P = 0.02$ ) as shown in Figure 4. These differences were not found when comparing platelet recovery between these two groups (median 14 days (9.19) and 12 (8.16), respectively,  $P = 0.5$ )



**Figure 4** Granulocyte recovery in PBPC transplanted patients with  $6.5 \times 10^6$   $CD34^+$  cells/kg (solid line) or more compared with lower  $CD34^+$  cells/kg (dashed line) ( $P = 0.01$ ).

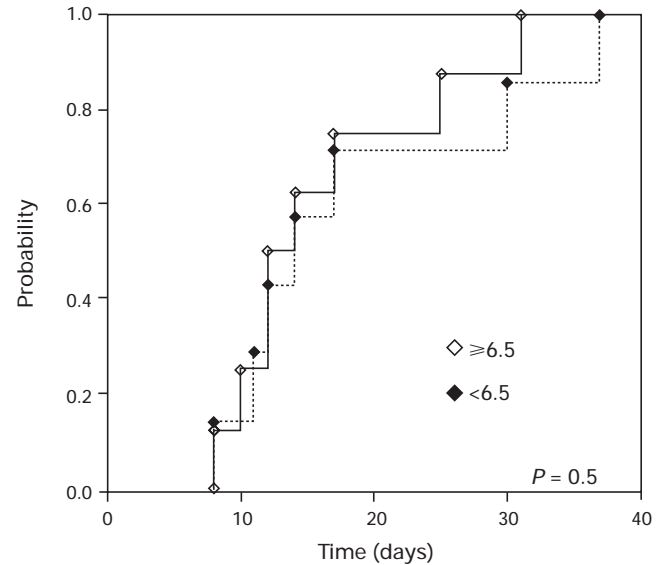
(Figure 5). No correlation was demonstrated between CFU-GM/kg infused and granulocyte or platelet recovery.

When analyzing BM autografts, we could not find any correlation between NC/kg, CFU-GM/kg and  $CD34^+$  cells/kg infused and granulocyte or platelet recovery. However, when the whole series was analyzed, including all BM and PBPC transplants, both  $CD34^+$  cells/kg and CFU-GM/kg infused were negatively correlated with granulocyte engraftment ( $r = -0.59$ ,  $P = 0.003$ ) and ( $r = -0.58$ ,  $P = 0.01$ ), respectively. These parameters also reached a significant correlation for platelet engraftment:  $CD34^+$  cells/kg ( $r = -0.44$ ,  $P = 0.03$ ), CFU-GM/kg ( $r = -0.49$ ,  $P = 0.04$ ).

### Discussion

The results presented in this report show that our B cell immunomagnetic purging method is capable of obtaining a high level of lymphoma cell depletion in FL patients. The purging efficiency as measured by flow cytometry was higher than 1.62 and 1.02 log in BM and PBPC, respectively. We also found that a second cycle of purging added a statistically significant higher target cell depletion as compared with only one cycle, in agreement with our previous work with purging in ALL.<sup>16</sup> However, the limited number of target cells in the PBPC before and after purging as well as the limited and nonspecific flow cytometry analysis using our approach hindered a correct analysis of B lymphocyte contamination since in many samples it was below our limits of detection.

More interesting results could be obtained from the data of PCR analysis. In two out of 12 BM and six out of 16 PBPC harvests, *bcl2* translocated lymphoma cells were detected by PCR. Thus, 28.5% of pre-purging samples were PCR+ which is similar to other reports.<sup>6</sup> The two BM-purged products remained PCR+ after purging but 50% of



**Figure 5** Platelet recovery of  $>20 \times 10^9/l$  in PBPC transplanted patients with  $6.5 \times 10^6$   $CD34^+$  cells/kg (solid line) or more compared with lower  $CD34^+$  cells/kg (dashed line) ( $P = 0.5$ ).

PBPC products became PCR negative. Interestingly, in 20% of the samples in which we were unable to detect malignant cells by PCR in the pre- and post-purging samples, the cellular fractions containing the IMB-target cell complexes were PCR+. This means that this purging strategy was highly effective and was able to concentrate enough tumor cells in the absorbed fraction to allow their detection by PCR. Therefore, in those samples the fresh cellular fraction was likely to be contaminated by malignant cells, although below our limit of detection by PCR. Overall, 42.8% of the samples were PCR positive in the fresh and/or absorbed cellular fraction and only 18.5% of them were positive in the purged product. Thus, 42% of patients were purged to PCR negativity. Several additional patients had a clear reduction in the intensity of the bcl2/IgH amplified band in the purged product as compared to the start and absorbed cellular fraction. This indicates that purging was efficient in the reduction of the tumor burden to some extent. Similar results have been reported by Gribben *et al*<sup>14</sup> using three MoAb and three cycles of complement lysis with a 3–6 log killing of tumor cell line and achieving a PCR bcl2 translocation-negative purged BM in 50% of patients with FL. A similar ‘*ex vivo*’ approach used by Johnson *et al*<sup>28</sup> was able to obtain a PCR-negative purged BM product in 14% of 29 patients with FL. The Dana-Faber group<sup>19</sup> also compared the efficiency of lymphoma cell depletion in BM with complement-mediated lysis and IMB. Their results indicated that the latter method achieved a better tumor cell depletion. Similarly, Kvalheim *et al*<sup>22</sup> reported a tumor cell depletion of more than 5 logs with this methodology as judged by clonogenic assays in experimental models using a lymphoma cell line.

In our study, no significant association was found between disease status or BM infiltration by lymphoma cells at purging and the ability to deplete bcl2+ cells from BM or PBPC. Association between tumor bulk in BM and inability to purge detectable lymphoma cells by PCR was shown by Gribben *et al*,<sup>14</sup> who could purge only two out of 11 BM harvests from patients with more than 10% of BM infiltration. Similarly, Negrin *et al*<sup>6</sup> reported that patients with BM involvement at purging had a significant higher percentage of PCR+ purged BM products as compared with patients who were morphologically normal. Although our results show that purging efficacy tended to be better in patients in CR and without BM involvement by histology, most of our purging procedures were performed with PBPC and the contribution of BM involvement by lymphoma cells in effectiveness of PBPC purging remains to be determined.

Recovery of NC and CD34<sup>+</sup> cells is also high and reproducible with this technique. Median yield of NC was of 59.3% and 77.2% in BM and PBPC products, respectively ( $P < 0.0005$ ). The higher cell loss found in BM products was due to specific target cell loss since no differences were found in nonspecific cell loss between BM and PBPC. We also obtained a higher yield of CD34<sup>+</sup> cells in PBPC than in BM-purged products (73.5% vs 56.1%, respectively,  $P = 0.001$ ). BM harvests had a significantly higher percentage of CD34<sup>+</sup> cells that co-expressed antigens in the B cell pool than PBPC. Thus, recovery of CD34<sup>+</sup> cells was expected to be lower when purging B cells from BM pro-

ducts. These data are also in agreement with the results from other groups.<sup>22,23</sup> The BM- and PBPC-purged products showed normal *in vitro* growth as determined by clonogenic assays, indicating that immunomagnetic purging did not negatively affect progenitor cell proliferation.

Purged BM and PBPC products showed normal *in vivo* proliferation capacity. Engraftment was complete and fast in all but one evaluable patient. Median time to reach an ANC  $>0.5 \times 10^9/l$  was 21 and 14 days for BM and PBPC autografts, respectively. Platelet counts over  $20 \times 10^9/l$  were achieved on day 41 and 14 with BM and PBPC autografts, respectively. These figures are comparable to those observed after transplantation of unmanipulated products containing similar numbers of LDCs or CD34<sup>+</sup> cells.<sup>29–31</sup> In this series the number of CD34<sup>+</sup> cells/kg infused with PBPC-purged products negatively correlated with the speed of neutrophil recovery after transplantation ( $r = -0.59$ ,  $P = 0.02$ ). Granulocyte engraftment was 2 days shorter for those patients transplanted with a median of  $7.3 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> cells/kg as compared to those transplanted with  $4.3 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> cells/kg (12 vs 14 days, respectively,  $P = 0.02$ ). These data are also similar to other series that reported a faster neutrophil recovery with the infusion of higher numbers of CD34<sup>+</sup> cells.<sup>32,33</sup> In PBPC autografts, the minimum number of CD34<sup>+</sup> cells/kg infused was so high that it did not allow us to appreciate significant differences in platelet recovery. No discernible effect on platelet recovery in patients receiving high numbers of CD34<sup>+</sup> cells/kg has been shown by others.<sup>33</sup> Also, the absence of a significant correlation between engraftment and the number of progenitor cells infused in the BM setting may result from the limited number of patients autografted. However, platelet and neutrophil recovery significantly correlated with both CD34<sup>+</sup> cells/kg and CFU-GM/kg infused, when the whole series was analyzed, which includes a broader range of progenitors.

From the data presented in this report, we cannot conclude which progenitor cell source is better in terms of purging. PBPC are increasingly replacing BM as the source of progenitor cells for autologous transplant because it facilitates progenitor cell collection, decreases the time to granulocyte and platelet engraftment, and is associated with decreased procedure-related toxicity.<sup>34</sup> It has also been reported that there are no differences in the concentration of bcl-2/IgH rearranged cells between BM and PBPC using a nested quantitative competitive PCR technique.<sup>10</sup> However, the higher cell number in PBPC than in BM grafts, might suggest a higher level of contamination by lymphoma cells. Despite its efficiency, the main limitation of PBPC purging with this immunomagnetic method is the higher cost of the procedure, since a mean of 10 times more IMB are required than when BM is used. However, the fast neutrophil and platelet engraftment showed with PBPC in relation to BM predict potential benefits in terms of numbers of red blood cell and platelet transfusions and time to discharge from hospital.<sup>35</sup>

In summary, our data demonstrate that immunomagnetic purging in BM as well as in PBPC is a safe and reproducible procedure and that the purged products are capable of normal engraftment after autologous transplantation. It is also able to obtain a substantial degree of lymphoma cell

depletion as shown by the absence of bcl2+ cells in nearly half of the purged products using a very sensitive PCR technique. Although no conclusive evidence exists showing a clinical benefit of purging, the main objective of a purging technique in autologous products should be to obtain tumor-free products as assessed by the use of a sensitive tumor detection method. Although efficient, in our method there still is a significant proportion of bcl2+ products by PCR after purging. In this sense, CD34+ enrichment in combination with tumor cell depletion is expected to achieve even higher levels of purging. Pre-clinical and clinical studies are ongoing with this latter approach in our laboratory.

## References

- Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A *et al*. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapse of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *New Engl J Med* 1995; **333**: 1540–1545.
- Rohatiner AZ, Johnson PW, Price CG *et al*. Myeloablative therapy with autologous bone marrow transplantation as consolidation therapy for recurrent follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 1994; **12**: 1177–1184.
- Freedman AS, Gribben JG, Neuberger D *et al*. High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation in patients with follicular lymphoma during first remission. *Blood* 1996; **88**: 2780–2786.
- Armitage JO. Bone marrow transplantation for indolent lymphomas. *Semin Oncol* 1993; **20** (Suppl. 5): 136–142.
- Stein RS, Ultmann JE, Byrne GA *et al*. Bone marrow involvement in non-Hodgkin's lymphomas: implication for staging and therapy. *Cancer* 1976; **37**: 629–636.
- Negrin RS, Pesendo J. Detection of tumor cells in purged bone marrow and peripheral-blood mononuclear cells by polymerase chain reaction amplification of bcl-2 translocation. *J Clin Oncol* 1994; **12**: 1021–1027.
- Benjamin D, Magrath IT, Douglass EC, Corash LM. Derivation of lymphoma cell lines from microscopically normal bone marrow in patients with undifferentiated lymphoma: evidence of occult bone marrow involvement. *Blood* 1983; **61**: 1017–1019.
- Yuan R, Dowling P, Zucca E *et al*. Detection of bcl-2/JH rearrangement in follicular and diffuse lymphoma: concordant results of peripheral blood and bone marrow analysis at diagnosis. *Br J Cancer* 1993; **67**: 922–925.
- Corradini P, Astolfi M, Cherasco C *et al*. Molecular monitoring of minimal residual disease in follicular and mantle cell non-Hodgkin's lymphomas treated with high-dose chemotherapy and peripheral blood progenitor cell autografting. *Blood* 1997; **2**: 724–731.
- Léonard BM, Héту F, Busque L *et al*. Lymphoma cell burden in progenitor cell grafts measured by competitive polymerase chain reaction: less than one log difference between bone marrow and peripheral blood source. *Blood* 1998; **91**: 331–339.
- Brenner MK, Rill DR, Moen RC *et al*. Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation. *Lancet* 1993; **341**: 85–86.
- Deisseroth A, Zu Z, Claxton D *et al*. Genetic marking shows that Ph+ cells present in autologous transplants of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow in CML. *Blood* 1994; **83**: 3068–3076.
- Sharp JG, Joshi SS, Armitage JO *et al*. Significance of detection of occult non-Hodgkin's lymphoma in histologically uninvolved bone marrow by a culture technique. *Blood* 1992; **79**: 1074–1080.
- Gribben JG, Freedman AS, Neuberger D *et al*. Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *New Engl J Med* 1991; **325**: 1525–1533.
- Hurd DD, LeBien TW, Lasky LC *et al*. Autologous bone marrow transplantation in non-Hodgkin's lymphoma: monoclonal antibodies plus complement for *ex vivo* marrow treatment. *Am J Med* 1988; **85**: 829–834.
- Uckun FM, Gajl-Peczalska K, Meyers DE *et al*. Marrow purging in autologous transplantation for T-lineage acute lymphoblastic leukemia; efficacy of *ex vivo* treatment with immunotoxins and 4-hydroperoxycyclophosphamide against fresh leukemic marrow progenitor cells. *Blood* 1987; **69**: 361–366.
- Canals C, Torrico C, Picón M *et al*. Immunomagnetic bone marrow purging in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Hematother* 1997; **6**: 261–268.
- Treleaven JG, Gibson FM, Ugelstad J *et al*. Removal of neuroblastoma cells from bone marrow with monoclonal antibodies conjugated to magnetic microspheres. *Lancet* 1984; **14**: 70–73.
- Gribben JG, Saporito L, Barber M *et al*. Bone marrow of non-Hodgkin's lymphoma patients with a bcl-2 translocation can be purged of polymerase chain reaction-detectable lymphoma cells using monoclonal antibodies and immunomagnetic bead depletion. *Blood* 1992; **80**: 1083–1089.
- Shimazaki C, Wisniewski D, Scheinberg DA *et al*. Elimination of myeloma cells from bone marrow by using monoclonal antibodies and magnetic immunobeads. *Blood* 1988; **72**: 1248–1254.
- Shpall EJ, Bast RC, Joines WT *et al*. Immunomagnetic purging of breast cancer from bone marrow for autologous transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1991; **7**: 145–151.
- Kvalheim G, Sorensen O, Fodstad O *et al*. Immunomagnetic removal of B-lymphoma cells from human bone marrow: a procedure for clinical use. *Bone Marrow Transplant* 1988; **3**: 31–41.
- Kvalheim G, Wang MY, Pharo A *et al*. Purging of tumor cells from leukapheresis products: experimental and clinical aspects. *J Hematother* 1996; **5**: 427–436.
- García J, Punti C, Picon M *et al*. Bone marrow purging in acute lymphoblastic leukemia: biological and clinical features. *J Hematother* 1994; **3**: 203–211.
- Gilmore MJML, Prentice HG, Corringham RE *et al*. A technique for the concentration of nucleated bone marrow cells for *in vitro* manipulation or cryopreservation using the IBM 2991 Blood Cell Processor. *Vox Sang* 1983; **45**: 294–302.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Drexler K, Jobs G, du Moulin A *et al*. PCR monitoring of minimal residual disease by quantitative PCR specific for t(14;18) chromosomal translocation in follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1994; **14**: 213 (Abstr. 476).
- Johnson PW, Price CG, Smith T *et al*. Detection of cells bearing the t(14;18) translocation following myeloablative treatment and autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 1994; **12**: 798–805.
- Haas R, Moos M, Karcher A *et al*. Sequential high-dose therapy with peripheral blood progenitor cell support in low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1994; **12**: 1685–1692.
- Brice P, Marolleau JP, Pautier P *et al*. Hematologic recovery and survival of lymphoma patients after autologous stem-cell

- transplantation: comparison of bone marrow and peripheral blood progenitor cells. *Leuk Lymphoma* 1996; **22**: 449–456.
- 31 Schmitz N, Linch DC, Dreger P *et al*. Randomised trial of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma patients. *Lancet* 1996; **347**: 353–357.
- 32 Ketterer N, Salles G, Raba M *et al*. High CD34<sup>+</sup> cell counts decrease hematologic toxicity of autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Blood* 1998; **91**: 3148–3155.
- 33 Bensinger W, Appelbaum F, Rowley S *et al*. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. *J Clin Oncol* 1995; **13**: 2547–2555.
- 34 Kessinger A, Armitage JO. The evolving role of autologous peripheral stem cell transplantation following high-dose therapy for malignancies. *Blood* 1991; **77**: 211–213.
- 35 Woronoff-Lemsi MC, Arveux P, Limat S *et al*. Cost comparative study of autologous peripheral blood progenitors cells (PBPC) and bone marrow (ABM) transplantation for non-Hodgkin's lymphoma patients. *Bone Marrow Transplant* 1997; **20**: 975–982.

## VI. DISCUSIÓN





El linfoma folicular es el tipo histológico más frecuente entre los linfomas no-hodgkinianos indolentes. A pesar de la alta frecuencia de respuestas obtenidas después de un primer tratamiento, la progresión de la enfermedad es la norma. Con el esquema clásico CHOP, el porcentaje de remisiones oscila entre el 60 y 80%, pero la mediana de supervivencia libre de progresión se sitúa entre 2 y 3 años y la mediana de supervivencia global entre 5 y 7 años.

Después de una primera progresión, los pacientes tratados con quimioterapia estándar tienen una mediana de supervivencia global de 4,5 años y de supervivencia libre de progresión de 1,7 años<sup>13</sup>. En el caso de los pacientes jóvenes, dicha supervivencia debe considerarse extremadamente corta y por ello hay que proponerse nuevas terapias de rescate.

En los linfomas indolentes, y en concreto en el linfoma folicular, no existen resultados definitivos que demuestren una prolongación de la supervivencia en los pacientes que consiguen una remisión clínica completa versus aquéllos en remisión parcial. Ello es debido, por un lado, a la supervivencia prolongada que se observa en muchos pacientes con enfermedad activa y por otro, al patrón continuo de recaídas en los pacientes en remisión. No obstante, actualmente existe una evidencia clara que la calidad de las respuestas obtenidas puede tener impacto sobre la supervivencia global. Así, la presencia de una remisión completa molecular tras quimioterapia de rescate<sup>24</sup> o TPH<sup>113,140</sup> se traduce en una mayor supervivencia en algunos estudios. Estos datos sugieren que para alcanzar una SLP prolongada, o incluso la curación, el primer paso sería la obtención de la mejor respuesta posible.

Mediante el trasplante de progenitores hematopoyéticos los pacientes reciben dosis altas de quimioterapia, asociadas o no a radioterapia, y posteriormente células madre hemopoyéticas para restablecer la mielopoyesis deprimida tras el tratamiento. Con la intensificación en la dosis de tratamiento se pretende vencer la resistencia de la enfermedad linfoproliferativa a la quimioterapia estándar. La toxicidad medular puede resolverse gracias al soporte con PH.<sup>79</sup>

En el trasplante autogénico, los PHSP se utilizan con mayor frecuencia que la médula ósea. El número de células CD34+ trasplantadas es un índice fiable del potencial de injerto. Para obtener el

mejor inóculo, las pautas de movilización suelen utilizar la combinación de quimioterapia y factores de crecimiento.

En las dos últimas décadas, hemos asistido a un incremento constante del número de pacientes con LF tratados con TPH, tanto autogénico como alogénico. Diversas razones pueden explicar este hecho: los buenos resultados iniciales obtenidos en pacientes con enfermedad avanzada y la disminución de la toxicidad relacionada con el procedimiento. La morbi-mortalidad debida al tratamiento intensivo se ha reducido gracias a los avances en el soporte de estos pacientes, a la aplicación de regímenes de acondicionamiento menos tóxicos, a la utilización de PH de sangre periférica que reduce el período de pancitopenia, a un mayor control de las infecciones, y en el caso del trasplante alogénico, a la mejora en la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped.

En los trabajos que conforman esta tesis se exponen los resultados del tratamiento de pacientes con LF en fase avanzada con el esquema IAPVP-16, una pauta poliquimioterápica de rescate diseñada en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, y del ulterior trasplante autogénico. Estos resultados describen la eficacia de este esquema como terapia antitumoral y como pauta de movilización de progenitores hematopoyéticos hacia la sangre periférica. También, se analiza la eficacia del trasplante autogénico en esta enfermedad.

#### **6.1. Tratamiento de rescate con quimioterapia tipo IAPVP-16 en pacientes con linfoma folicular refractario o en recaída**

En este trabajo se estudia un nuevo esquema de rescate, que combina fármacos que previamente se han demostrado activos frente al LF y que configuran el esquema IAPVP-16. Este tratamiento se administró a 44 pacientes en recaída, remisión parcial o primariamente refractarios,

con una edad mediana de 49 años. Se obtuvo con rapidez un alto porcentaje de respuestas, un 80%, de las que el 41% fueron completas, tras un corto período de tratamiento. La mediana de tiempo para la obtención de la remisión en nuestros pacientes fue de sólo 3 meses.

De las variables analizadas como posibles factores predictivos de respuesta (sexo, edad, quimiosensibilidad, IPI, tiempo desde el diagnóstico hasta el inicio del tratamiento con IAPVP-16 y número de líneas de tratamiento recibidas previamente) sólo el IPI bajo/ intermedio-bajo, frente a alto/ intermedio-alto se asoció de forma significativa a una mayor proporción de respuestas (86% frente al 43%, respectivamente,  $P < 0,02$ ).

Debido a que los criterios de inclusión y la definición de respuesta varían de un estudio a otro, no podemos comparar de una manera estricta nuestros resultados con los obtenidos en trabajos realizados en otros centros con diversas modalidades de tratamiento de segunda línea, como las combinaciones quimioterápicas DHAP, ESHAP o MIME, la utilización de los análogos de las purinas en monoterapia o en combinación, o la terapia con antiCD20 (ver tabla 3 del Manuscrito 1). Nuestro porcentaje de respuestas parece similar o incluso superior en algunos casos. Así, el tratamiento con DHAP o MIME permite alcanzar alrededor de un 50% de respuestas y el tratamiento con ESHAP sólo o alternado con MINE, consigue hasta un 80% de remisiones<sup>47</sup>. Con fludarabina y cladribina, el porcentaje de respuestas en monoterapia<sup>52,56</sup> llega al 50%, y en combinación con otros agentes, como los esquemas FCM y FMD, se alcanza el 90%.<sup>49,50</sup> Rituximab en monoterapia obtiene entre un 48% y un 57% de respuestas según las series, con mínima toxicidad,<sup>58,59</sup> y administrado con quimioterapia tipo CHOP el índice de respuestas puede llegar al 95%.<sup>60</sup> La combinación de rituximab con interferón alcanza el 70% de respuestas<sup>61</sup> y con fludarabina más mitoxantrone el 95%.<sup>62</sup>

Con el objetivo de prolongar la SLP después de la respuesta al IAPVP-16, el protocolo se modificó en 1992 de modo que todos los pacientes que respondieron recibieron un TPH en los 3 meses siguientes. Como hemos expuesto anteriormente el esquema IAPVP-16 seguido de G-CSF es un excelente tratamiento de movilización de células progenitoras a sangre periférica en neoplasias

linfoides. Por lo tanto, este esquema permitió tratar concomitantemente la enfermedad de base y al mismo tiempo obtener suficientes células progenitoras para la realización de un trasplante hematopoyético en la mayoría de pacientes.

La comparación de la SLP y la SG entre los pacientes que respondieron y que no respondieron al tratamiento con IAPVP-16 (hubieran o no recibido TPH), muestra diferencias estadísticamente significativas; así, la mediana de SLP fue de 33 meses en los que respondieron vs 11 meses en los que no respondieron ( $P=0,05$ ). Del mismo modo, la mediana de la supervivencia global no se alcanzó en los que presentaron respuesta y fue de 23 meses en los que no respondieron ( $P=0,0005$ ). La respuesta favorable a la quimioterapia IAPVP-16 se asoció a una prolongación de la supervivencia.

El tratamiento con IAPVP-16 se toleró bien en la mayoría de los pacientes. No hubo ningún fallecimiento relacionado con la terapia. Dicho esquema produjo una toxicidad hematológica grave. Se observó trombocitopenia intensa en el 66% de los ciclos, aunque no hubo episodios hemorrágicos graves. Se evidenció neutropenia intensa en todos los ciclos y en el 56% de ellos se acompañó de fiebre neutropénica, aunque sólo 4 episodios se consideraron graves. Los episodios de fiebre neutropénica obligaron a reingreso hospitalario en el 60% de los ciclos. Es de destacar que este índice se redujo al 25% al intensificarse la profilaxis antibacteriana<sup>100</sup> La toxicidad no hematológica fue leve o moderada ya que la mayoría de los pacientes con linfoma indolente en recaída o refractario tienen más de 60 ó 65 años, la toxicidad hematológica del esquema IAPVP-16 es sin duda el mayor factor limitante para su uso en los pacientes de edad avanzada.

En resumen, el esquema IAPVP-16 obtiene un alto porcentaje de respuestas completas y parciales en LF refractarios o en recaída, con toxicidad aceptable. Ello permite en la mayoría de los pacientes llegar a la fase de TPH con una óptima reducción tumoral.

## 6.2. Movilización de células progenitoras a sangre periférica tras quimioterapia de rescate tipo IAPVP-16 y G-CSF en síndromes linfoproliferativos

Los resultados del tratamiento IAPVP-16 como pauta para movilizar células progenitoras a sangre periférica indican que el esquema es muy útil en pacientes con linfoma en fase avanzada, además de tener una excelente eficacia antitumoral.

En el estudio que presentamos se trató a 45 pacientes diagnosticados de neoplasias linfoides (LNH, linfoma de Hodgkin y mieloma múltiple) en recaída o primariamente refractarios. La toxicidad fue similar a la descrita en el primer trabajo.

Para analizar la eficacia en la movilización de nuestro esquema se definieron dos dosis de células CD34+. Una recolección adecuada se definió como la obtención entre 2 y 5 x 10<sup>6</sup>/Kg células CD34+, y óptima como la obtención de  $\geq 5 \times 10^6$ /Kg células CD34+. La mayor parte de los estudios realizados a este respecto identificaron estas dos cifras como las que garantizan un injerto correcto en el caso de la primera y favorecen un injerto rápido de las tres líneas hematopoyéticas en el caso de la segunda.<sup>84,85</sup>

En más del 90% de nuestros pacientes se consiguió una recogida adecuada, y en más del 70% ésta fue óptima, incluidos 7 de 10 pacientes en los que otros intentos de movilización anteriores habían fracasado. La mediana de células CD34+ obtenidas fue de 8,4 x 10<sup>6</sup>/Kg. Esto se consiguió con tan solo una mediana de 2 leucoaféresis. Estos resultados hacen al esquema IAPVP-16 especialmente atractivo en pacientes incluidos en protocolos de doble trasplante, o de selección de células CD34+ "ex vivo".

Otras combinaciones han obtenido resultados similares, Weaver publicó en 1997 los excelentes resultados obtenidos con ciclofosfamida, etopósido y G-CSF en pacientes con diferentes tipos de neoplasias, con una mediana de 2 leucoaféresis consiguió en el 91% de los pacientes una cifra adecuada de células CD34+.<sup>100</sup> Otros autores han utilizado combinaciones de etopósido y G-CSF, con o sin ifosfamida, en pacientes con neoplasias linfoides en fase avanzada, algunos de ellos

con fallo de movilización previo, y han obtenido una cifra adecuada del 86% al 100% de casos.<sup>101-103</sup> La administración de ciclofosfamida y G-CSF no ha conseguido en general resultados tan óptimos.<sup>96,171</sup>

De particular importancia en la práctica clínica es la identificación de los pacientes con riesgo de fracaso en la movilización. En nuestra serie, los factores que influyeron negativamente en la obtención de un número adecuado u óptimo de células CD34+ fueron: fracaso previo de movilización, recuento plaquetario  $< 150 \times 10^9/l$ , radioterapia previa y un intervalo de tiempo mayor a un año entre diagnóstico y tratamiento de movilización. Estos factores pronósticos se han identificado también en estudios previos.<sup>86-92</sup> En cambio, existe otro factor negativo identificado en otros estudios, el número de líneas de tratamiento recibidas previamente, que en nuestro trabajo no resultó estadísticamente significativo.

Pensamos que una observación interesante de nuestro estudio fue el valor predictivo del recuento plaquetario basal, que es supuestamente un marcador de la reserva medular en pacientes muy tratados. Este parámetro lo estudió previamente Weaver<sup>92</sup> quien lo consideró el más importante.

Otra cuestión de especial interés en el tratamiento con IAPVP-16 es la capacidad de predecir el primer día de movilización efectiva de células CD34+. Esta ocurrió en todos los casos entre los días 11 y 14 desde el inicio del tratamiento. En el 80% de ocasiones, esta movilización tuvo lugar en el día 12, lo que permitió programar adecuadamente las aféresis y reducir los cambios en la programación que alteran la dinámica de trabajo en la unidad de aféresis y en el laboratorio de procesamiento de los productos de aféresis.

Otra aportación interesante de nuestro estudio fue identificar la correlación que existe entre el recuento de células CD34+ en la sangre periférica a primera hora de la mañana y el contenido de células CD34+ y CFU-GM en el producto de aféresis obtenido ese mismo día. En nuestro estudio existió una correlación estadísticamente significativa ( $r=0,73$ ,  $p<0,001$ ) entre ambas variables. Esta correlación también la observaron otros autores.<sup>96,172-174</sup> El recuento de células CD34+ en la sangre periférica a primera hora de la mañana debe utilizarse como criterio para el inicio de los

procedimientos de leucoaféresis. Así, una cifra  $> 17$  células CD34+/ $\mu$ l en sangre periférica predijo la obtención de un número adecuado de células CD34+ en una sola leucoaféresis en la mayoría de pacientes (92%). Otros autores han identificado otros valores que van hasta 50 células CD34+/ $\mu$ l en sangre periférica<sup>88</sup> (ver tabla 5 Manuscrito 3). No obstante se deben evitar comparaciones entre estudios porque la población de pacientes y el tratamiento de movilización utilizado fueron diferentes, así como los métodos de identificación de las células CD34+ y los volúmenes procesados en las leucoaféresis.

Por todo lo anteriormente descrito, podemos decir que el esquema IAPVP-16 seguido de G-CSF es altamente efectivo como tratamiento movilizador de PHSP en pacientes con neoplasias linfoides incluidos los linfomas indolentes en fase avanzada, inclusive en aquéllos con antecedentes de fracaso de movilización previo.



### 6.3. Trasplante autogénico de progenitores hematopoyéticos en linfoma folicular en fase avanzada

Presentamos en este trabajo los resultados del tratamiento con trasplante autogénico en 30 pacientes con LF en fase avanzada (primera remisión completa con factores de mal pronóstico, segunda remisión completa, remisión parcial, recaída sensible y enfermedad resistente). Los PH procedían de MO en 8 y de SP en los 22 restantes. En 13 casos los PH se trataron "ex vivo" con un método inmunomagnético que utiliza anticuerpos anti-B para la depleción de células B

Según nuestros resultados, la realización de un TAPH ofrece un porcentaje alto de respuestas en pacientes con LF en fase avanzada. Así, a los 3 meses del trasplante, el 86% de los pacientes se hallaban en remisión completa y el 14% en remisión parcial, con una mejora en el estado de la enfermedad en 14 casos de 30 (de respuesta parcial a completa y de no-respuesta a respuesta parcial). Con un seguimiento mediano de 19 meses, el 69% persistía en remisión completa y el 7% en remisión parcial.

Además, de 17 pacientes evaluables para la comparación del intervalo libre de progresión pre y postrasplante, diez casos habían superado la duración de la respuesta en el intervalo postrasplante, y 5 permanecían en remisión sin haberlo superado todavía.

Una limitación de este trabajo es el seguimiento todavía limitado de los pacientes tras el procedimiento. En la mayoría de estudios publicados, a pesar del número elevado de respuestas con el tratamiento intensivo, existe un patrón continuo de recidiva de la enfermedad; y no existe por el momento una evidencia definitiva de que la terapia intensiva prolongue la supervivencia.<sup>105, 131-146</sup>

Nuestro estudio presenta una supervivencia libre de progresión y supervivencia global estimada a 2 años del 57 % y 83 %, respectivamente. Estudios previos han obtenido resultados similares,<sup>131-146</sup> aunque es difícil comparar nuestra serie con las de otras instituciones, ya que existen entre ellas diferencias en parámetros como el estado de la enfermedad al trasplante, la fuente de los PH, el esquema de acondicionamiento y la utilización o no de diferentes técnicas de tratamiento "ex

---

vivo" de los progenitores. Respecto a pacientes con enfermedad en recaída o resistente, en el DFCI se trataron 153 pacientes que presentaron una SLP y una SG estimada a 8 años de 42% y 66% respectivamente.<sup>131</sup> En el S.Bartholomew's Hospital se habían tratado 99 pacientes, la SLP y SG estimada a 5 años fue del 63% y 69%, respectivamente.<sup>132</sup> En ambos centros los PH procedían de MO y habían sido tratados con AcMo anti-B. Bierman publicó los resultados obtenidos en 100 pacientes, la SLP y SG a 4 años se estimó en el 44% y 65%, respectivamente, en este caso los PH no fueron tratados "ex vivo" y procedían de MO y SP.<sup>134</sup> El grupo de Lyon trató 60 pacientes y la SLP y SG estimada a 2 años fue del 53% y 86% respectivamente, la fuente de PH fue la SP y tampoco se trataron "ex vivo".<sup>135</sup> En cuanto a los resultados del trasplante autogénico en pacientes en primera remisión, en algunas de las series más importantes publicadas como son las del DFCI, Turín y Stanford, las SLP y SG estimadas a 3, 9 y 10 años respectivamente, se encuentran alrededor del 60% la primera y el 80% la segunda.<sup>140-142</sup>

La mortalidad relacionada con el procedimiento fue baja, un único caso de 30 pacientes, es decir, menor al 5% como se acepta generalmente. Durante el seguimiento del estudio no observamos complicaciones tardías, como el desarrollo de síndrome mielodisplásico o de leucemia aguda secundaria. Es preciso un seguimiento más prolongado para descartar con mayor seguridad la aparición de estas complicaciones en nuestra serie.

Es evidente que sería de gran importancia la identificación de los pacientes que podrían realmente beneficiarse de la terapia intensiva, en términos de supervivencia libre de progresión. En nuestra serie, ninguna de las variables analizadas tuvo valor predictivo de progresión tras el TPH. Esto podría deberse a la gran eficacia del procedimiento, con sólo 8 casos de progresión en el tiempo de seguimiento del estudio.

En diversos estudios publicados se han detectado algunos factores pronósticos para progresión postrasplante. El número de líneas de tratamiento previamente recibidas fue un factor negativo en varias series.<sup>133,134</sup> En cambio, la ausencia del reordenamiento para bcl-2 postrasplante se asoció a una mayor SLP, en un estudio llevado a cabo por investigadores del DFCI, en pacientes

en recaída<sup>113</sup> y en primera remisión considerados de alto riesgo,<sup>140</sup> tratados con trasplante autogénico.

En conclusión, el trasplante hematopoyético autogénico en los pacientes diagnosticados de LF en fase avanzada permitió obtener, en nuestra experiencia, un alto porcentaje de respuestas, en general más prolongadas que la duración de la remisión previa. Además la mortalidad relacionada con el procedimiento fue muy baja. Evidentemente, es necesario un seguimiento más prolongado para identificar posibles recaídas tardías y complicaciones a largo plazo derivadas del tratamiento. Sólo así se podrá determinar con mayor precisión la mejora o no de la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global que puede aportar este procedimiento. Asimismo, sería necesario hallar factores pronósticos que identificaran qué grupo de pacientes podría beneficiarse de esta terapia y cuál no.

## VII. CONCLUSIONES



### 7.1. Tratamiento de rescate con quimioterapia tipo IAPVP-16 en pacientes con linfoma folicular refractario o en recaída

1. El esquema IAPVP-16 permite obtener una proporción elevada de respuestas completas (41%) y de respuestas parciales (39%) en pacientes diagnosticados de LF refractario o en recaída, lo que hace posible que la mayoría de los pacientes candidatos puedan alcanzar la fase de TAPH con una óptima reducción tumoral.
2. Consideramos que el perfil de toxicidad es aceptable. A pesar de que la toxicidad hematológica fue intensa, no hubo complicaciones hemorrágicas graves y sólo aparecieron complicaciones infecciosas severas en 4 casos. No hubo fallecimientos relacionados con el tratamiento y la toxicidad no hematológica fue leve o moderada y siempre reversible.
3. El Índice Pronóstico Internacional (bajo/ intermedio-bajo frente a alto/ intermedio-alto) fue el único parámetro predictivo de la respuesta al tratamiento. La tasa de respuestas en el grupo con IPI bajo/intermedio- bajo fue del 86% frente al 43% en el grupo con IPI alto/ intermedio-alto  $P < 0,02$ .

## 7.2. Movilización de células progenitoras a sangre periférica tras quimioterapia de rescate tipo IAPVP-16 y G-CSF en síndromes linfoproliferativos

1. El esquema IAPVP-16 más G-CSF es un tratamiento movilizador de progenitores hematopoyéticos a sangre periférica efectivo en pacientes con neoplasias linfoides en fase avanzada, incluso en aquéllos en los que otras pautas previas fracasaron. En el 91% de los pacientes se obtuvo más de  $2 \times 10^6$  células CD34+/Kg y en el 70%, más de  $5 \times 10^6$ CD34+/kg.
2. La toxicidad hematológica fue intensa, pero de corta duración. La toxicidad no hematológica fue leve.
3. Los factores que significativamente influyeron negativamente sobre el número de células CD34+ recogidas fueron los antecedentes de fracaso en movilizaciones anteriores y un recuento plaquetar bajo, previo al tratamiento movilizador ( $<150 \times 10^9/l$ ).
4. Se halló una buena correlación entre la cifra de células CD34+ circulantes en sangre periférica el día de la aféresis y la cifra de células CD34+ y de CFU-GM en los productos de leucoaféresis ( $r=0.93$  y  $r=0.73$ ,  $p<0.001$ ). Mediante la ecuación de la regresión lineal, calculamos que un número  $\geq 17$  CD34+ células /  $\mu l$  circulantes en sangre periférica el día de la aféresis predijo la obtención de más de  $2 \times 10^6$ /Kg células CD34+ en una sola leucoaféresis, en más del 90% de casos.

### 7.3. Trasplante autogénico de progenitores hematopoyéticos en linfoma folicular en fase avanzada

1. En nuestra experiencia el TPHA en pacientes con LF en fase avanzada obtiene o mantiene una alta proporción de respuestas.
2. Las respuestas se prolongan en el tiempo más que el último periodo de remisión, en la mayoría de los pacientes.
3. La toxicidad relacionada con el procedimiento fue baja, con un solo fallecimiento, lo que supone una mortalidad del 3%. Es necesario un seguimiento más prolongado para identificar con precisión la frecuencia de complicaciones tardías.
4. La supervivencia global estimada a 2 años fue del 83% (IC95%, 64%-100%) y la supervivencia libre de progresión del 57% (IC95%, 34%-81%).
5. Ninguna variable analizada fue predictiva para progresión o supervivencia en nuestro estudio, lo que se debe probablemente a la baja frecuencia de eventos observados.



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. Harris NL, Jaffe ES, Stein H et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84: 1361-1392.
2. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting-Airlie House, Virginia, november 1997. *J Clin Oncol* 1999; 12: 3835-3849.
3. Tormo M, Tari AM, McDonnell TJ, Cabanillas F, García-Conde J and López-Berestein G. Apoptotic induction in transformed follicular lymphoma cells by bcl-2 downregulation. *Leukemia and Lymphoma* 1998; 30: 367-379.
4. Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family and regulation of programmed cell death. *Cancer Research* 1999; 59 (Supl.): 1693s-1700s.
5. Morgan DS and Horning SJ. The indolent lymphomas. En: Freireich EJ and Karterjian HM, eds. *Medical management of Hematological Malignant Diseases*. New York , 1998; 205-232.
6. Rohatiner A and Lister A. Follicular lymphoma. En: Magrath I, eds. *The Non-Hodgkin's Lymphomas*. London, 1999; 867-895.
7. Testoni N, Gamberi B, Ruggeri D, Carboni C, Pelliconi S. Cytogenetics of indolent lymphomas. *Haematologica* 1999; 84: (Supl. 10): 6-9.
8. Gaidano G, Capello D, Fassone L, Vivenza D, Ariati C, Volta C, Saglio G. Molecular pathophysiology of indolent lymphomas. *Haematologica* 1999; 84 (Supl. 10): 10-14.
9. Horsman DE, Connors JM, Pantzar T, Gascoyne RD. Analysis of secondary chromosomal alterations in 165 cases of follicular lymphoma with t(14;18). *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 30: 375-382.
10. Young NS. The Epidemiology of Blood Diseases. En: *Educational Program of American Society of Hematology Congress*. Miami 1999; 58-63.
11. Salar A, Fernández de Sevilla A, Romagosa V et al. Distribution and incidence rates of lymphoid neoplasms according to the REAL classification in a single institution. A prospective study of 940 cases. *Eur J Haematol* 1997; 59: 231-237.

12. Solal-Celigny P. Management of histologically indolent non-Hodgkin's lymphomas. *Bailliere's Clinical Hematology. Non-Hodgkin's lymphomas* 1996; 9: 669-687.
13. Johnson PWM, Rohatiner AZS, Whelan JS et al. Patterns of survival in patients with recurrent follicular lymphoma: a 20-year study from a single center. *J Clin Oncol* 1995; 13:140-147.
14. Decaudin D, Lepage E, Brousse N. Low-grade stage III-IV follicular lymphoma: multivariate analysis of prognostic factors in 484 patients – a study of the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2499-4505.
15. Pizzolo G, Vinante F, Chilosi M. Biological prognostic factors in indolent lymphoma. *Haematologica* 1999; 84 (Supl 10):18-24.
16. López-Guillermo A, Cabanillas F, McDowell TI et al. Correlation of bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma. *Blood* 1999; 93: 3081-3087.
17. Romaguera JE, McLaughlin P, North L et al. Multivariate analysis of prognostic factors in stage IV follicular low-grade lymphoma: a risk model. *J Clin Oncol* 1991; 9: 762-769.
18. Leonard R, Hayward R, Prescott R et al. The identification of discrete prognostic groups in low grade non-Hodgkin's Lymphoma. *Ann Oncol* 1991; 2: 655-662.
19. López-Guillermo A, Monserrat E, Bosch F, Terol MJ, Campo E, Rozman C. Applicability of the international index for aggressive lymphomas to patients with low-grade lymphoma. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1343-1348.
20. Litam P, Swan F, Cabanillas F et al. Prognostic value of serum Beta-2 microglobulin in low-grade lymphoma. *Ann Inter Med* 1991; 9: 762-769.
21. Federico M, Vitolo U, Zinzani PL et al. Prognosis of follicular lymphoma: a predictive model based on a retrospective analysis of 987 cases. *Blood* 2000; 95: 783-789.
22. Mounier N, Gisselbrecht C. Prognostic factors in follicular lymphomas: a clinical and methodologic challenge. *Haematologica* 1999; 84 (Supl. 10): 15-17.
23. López-Guillermo A, Monserrat E, Bosch F et al. Low-grade lymphoma: clinical and prognostic studies in a series of 143 patients from a single institution. *Leukemia and Lymphoma* 1994; 15: 159-165.

24. López-Guillermo A, Cabanillas F, McLaughlin P et al. The clinical significance of molecular response in follicular lymphomas. *Blood* 1998; 91: 2955-2960.
25. Horning SJ, Rosenberg SA. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1984; 311: 1471-1475.
26. Besa PC, Mc Laughlin PW, Cox JD, Fuller LM. Long term assessment of patterns of treatment failure and survival in patients with stage I and II follicular lymphomas. *Cancer* 1995; 75: 2361-2367.
27. Portlock CS, Fischer DS, Lundberg WB et al. High-dose pulse chlorambucil in advanced, low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Treat Rep* 1987; 71: 1029-1031.
28. Kimby E, Bjorkholm M, Gahrton G et al. Chlorambucil/prednisone vs. CHOP in symptomatic low-grade non-Hodgkin's lymphomas: a randomized trial from the Lymphoma Group of Central Sweden. *Ann Oncol* 1994; 5 (Supl. 2): 67-71.
29. Unterhalt M, Herrmann R, Tiemann M et al. Prednimustine, mitoxantrone (PmM) vs cyclophosphamide, vincristine, prednisone (COP) for the treatment of advanced low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 1996; 10: 836-843.
30. Dana BW, Dahlberg S, Bharat NN et al. Long-term follow-up of patients with low-grade malignant lymphomas treated with doxorubicin-based chemotherapy or chemoimmunotherapy. *J Clin Oncol* 1993; 11: 644-651.
31. Lepage E, Sebban C, Gisselbrecht C et al. Treatment of low-grade non-Hodgkin's lymphomas: assessment of doxorubicin in a controlled trial. *Hematol Oncol* 1990; 8: 31-39.
32. Kalter S, Holmes F, Cabanillas F. Long term results of treatment of patients with follicular lymphoma. *Hematol Oncol* 1987; 5: 127-138.
33. Solal-Celigny P, Brice P, Brousse N et al. Phase II trial of fludarabine monophosphate as firstline treatment in patients with advanced follicular lymphoma: a multicentre study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 1996; 14: 514-519.
34. Hochster HS, Oken MM, Winter JN et al. Phase I study of fludarabine plus cyclophosphamide in patients with previously untreated low-grade lymphoma: results and long-term follow-up- A report from the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2000; 18: 987-994.

35. Zinzani PL, Magagnoli M, Bendandi M et al. Efficacy of fludarabine and mitoxantrone (FN) combination regimen in untreated indolent non-Hodgkin's lymphomas. *Ann Oncol* 2000; 11: 363-365.
36. Crawley CR, Fornan JM, Gupta RK et al. A phase II study to evaluate the combination of fludarabine, mitoxantrone and dexamethasone (FMD) in patients with follicular lymphoma. *Ann Oncol* 2000; 11: 861-865.
37. López-Guillermo A, Estany C, Domingo E et al. Tratamiento de primera línea con fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrone (FCM) en pacientes < 65 años con linfoma folicular. Análisis preliminar de los primeros 25 pacientes. *Haematologica* 2001; 86 (Supl. 2): 58a.
38. Montoto S, López-Guillermo A, Domingo-Domènech E et al. Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone (FCM) regimen as first-line therapy in younger patients with advanced stage follicular lymphoma. *Ann Oncol* 2002, 13 (Supl. 2): 184 a.
39. Mauch P. The role of radiation therapy. *Haematologica* 1999; 84 (Supl. 10): 33-37.
40. Cheson BD. New therapeutic strategies for the treatment of indolent non-Hodgkin's lymphomas. Educational Program of American Society of Hematology Congress. Miami 1999; 291-297.
41. Hainsworth JD. Rituximab as first-line and maintenance therapy for patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma: interim follow-up of a multicenter phase II trial. *Semin Oncol* 2002; 29 (Supl.2): 25-29.
42. Colombat P, Salles G, Brousse N et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as first-line therapy for patients with follicular lymphoma with a low-burden tumor: clinical and molecular evaluation. *Blood* 2001; 97: 101-106.
43. Rohatiner AZS, Gregory W, Peterson B et al A meta-analysis of randomised trials evaluating the role of interferon as treatment for follicular lymphoma. *Proc ASCO* 1998; 17: 4a.
44. Fisher RI, Dana WB, LeBlanc M et al. Interferon alpha after intensive chemotherapy does not prolong the progression-free survival of patients with low-grade non-Hodgkin's lymphoma: results of the Southwest Oncology Group randomized phase III study 8809. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2010-2016.
45. Cabanillas F, Hagemester FB, Bodey GP et al. IMVP-16, an effective pauta for patients with lymphoma who have relapsed after initial combination chemotherapy. *Blood* 1982; 60: 693-697.

46. Cabanillas F, Hagemeister FB, McLaughlin P et al. Results of MIME salvage pautas for recurrent or refractory lymphoma. *J Clin Oncol* 1987; 5: 407-412.
47. Rodriguez-Monge, Cabanillas F. Long-term follow-up of platinum-based lymphoma salvage pautas. *Hematol Oncol Clin N Am* 1997; 11: 937-947.
48. Rodriguez FC, Cabanillas F, Velasquez WS et al. Results of a salvage treatment program for relapsing lymphoma: MIME consolidated with ESHAP. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1734-1741.
49. Ferrer AFA, Bosch F, López-Guillermo A et al. Phase II study of fludarabine with cyclophosphamide and mitoxantrone (FCM) in resistant or relapsed indolent lymphoproliferative disorders. *The Hematology Journal* 2001; 1 (Supl. 1): 131a.
50. McLaughlin P, Hagemeister FB, Romaguera JE et al. Fludarabine, mitoxantrone and dexamethasone: an effective new pautas for indolent lymphoma. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1262-1268.
51. Zinzani PL, Bendandi M, Tura S. FMP pautas (fludarabine, mitoxantrone, prednisone) as therapy in recurrent low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 1995; 55: 262-266.
52. Pigaditou A, Rohatiner AJS, Whelan JS et al. Fludarabine in low-grade lymphoma. *Semin Oncol* 1993; 20: 24-27.
53. Hochster HS, Kyungmann Kim, Green MD et al. Activity of fludarabine in previously treated non-Hodgkin's low-grade lymphoma: results of an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1992; 10: 28-32.
54. Saven A, Lee T, Kosty M, Piro L. Cladribine and mitoxantrone dose escalation in indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2139-2144.
55. Hoffman M, Tallman MS, Hakimian D et al. 2-Chlorodeoxyadenosine is an active salvage therapy in advanced indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1994; 12: 788-792.
56. Kay AC, Saven A, Carrera CJ et al. 2-Chlorodeoxyadenosine treatment of low-grade lymphomas. *J Clin Oncol* 1992; 10: 371-377.
57. Davis TA, Maloney DG, Czerwinski DK, Liles TM and Levy R. Anti-idiotypic antibodies can induce long-term complete remissions in non-Hodgkin's lymphoma without eradicating the malignant clone. *Blood* 1998 ; 92: 1184-1190.

58. McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2825-2833.
59. Piro LD, White CA, Grillo-López AJ et al. Extended Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) therapy for relapsed or refractory low-grade or follicular lymphoma. *Ann Oncol* 1999; 10: 655-661.
60. Czuczman MS, Grillo-López AJ, White CA et al. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti CD-20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999; 17: 268-276.
61. Sacchi S, Ferderico M, Vitolo U et al. Clinical activity and safety of combination immunotherapy with interferon- $\alpha$ 2a and rituximab in patients with relapsed low grade non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2001; 86: 951-958.
62. Recasens V, Giraldo P, Pelegrin F et al. Monoclonal anti-CD20 Rituximab therapy combined with fludarabine-mitoxantrone regimen for relapsed follicular lymphoma. *The Hematology Journal* 2001; 1 (Supl 1): 532a.
63. Czuczman MS, Grillo-López AJ, McLaughlin P et al. Clearing of cells bearing the bcl-2 [t(14;18)] translocation from blood and marrow of patients treated with rituximab alone or in combination with CHOP chemotherapy. *Ann Oncol* 2001; 12: 109-114.
64. Press OW. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphomas. *Haematologica* 1999; 84 (Supl 10): 63-66.
65. Vose JM, Wahl RL, Saleh M et al. Multicenter phase II study of Iodine-131 tositumomab for chemotherapy-relapsed/refractory low-grade and transformed low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1316-1323.
66. Witzig TE. The use of ibritumomab tiutexan radioimmunotherapy for patients with relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol* 2000; 27 (Suppl 12): 74-78.
67. Kaminski MS, Estes J, Zasadny KR. Radioimmunotherapy with  $^{131}\text{I}$  tositumomab for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma: updated results and long-term follow-up of the University of Michigan experience. *Blood* 2000; 96:1259-1266.
68. Liu SY, Eary JF, Petersdorf SH et al. Follow-up of relapsed B-cell lymphoma patients treated with iodine-131-labeled anti-CD20 antibody and autologous stem-cell rescue. *J Clin Oncol* 1998; 16:



3270-3278.

69. Press OW, Eary JF, Gooley T et al. A phase I/II trial of iodine-131-tositumomab (anti-CD20), etoposide, cyclophosphamide, and autologous stem cell transplantation for relapsed B-cell lymphomas. *Blood* 2000; 96: 2934-2942.
70. Stevenson FK. Vaccine strategies in indolent lymphoma. Educational Program of American Society of Hematology Congress. Miami 1999; 312-318.
71. Gribben JG. Adoptive immunotherapy for B-cell lymphoma. *Haematologica* 1999; 84 (Supl 10): 67-69.
72. García-Conde J, Terol MJ, Tormo M. Proyección terapéutica de la clasificación REAL/OMS de los síndromes linfoproliferativos. *Hematol Citocinas Inmunoter Ter Cel* 1999; 2: 225-260.
73. Hsu FJ, Caspar CB, Czerwinski D et al. Active idiotype vaccination following chemotherapy induces a specific anti-tumor immune response and prolongs remission in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 1996;7 (Supl. 3): 19
74. Nelson EL, Li X, Hsu FJ et al. Tumor specific cytotoxic T-lymphocyte response after idiotype vaccination for B-cell, non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1996; 88: 580-589.
75. Hsu FJ, Benike C, Fangoni F et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2: 52-58
76. Schultze J, Cardoso A, Boussiotis V et al. Generation of anti-follicular lymphoma specific T cell mediated immunity. *Ann Oncol* 1996; 7 (Supl. 3): 19.
77. Webb A, Cunningham D, Cotter F et al. Bcl-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 1997; 349: 1137-1141.
78. Waters JS, Webb A, Cunningham D et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2000; 18; 1812-1823.
79. Horning SJ, Nademanee AP. Autologous Hematopoietic Cell Transplantation for non-Hodgkin lymphoma. En: Thomas ED, Blume KG and Forman SJ, eds. *Hematopoietic Cell Transplantation*. USA 1999, 939- 951.

80. Gratwohl A, Hermans J, Baldomero H. Blood and marrow transplantation activity in Europe 1995. European group for blood and marrow transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant* 1997; 407-419.
81. Champlin RE, Schmitz N, Horowitz M et al. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. *Blood* 2000; 95: 3702-3709.
82. To LB, Roberts MM, Haylock DN et al. Comparison of haematological recovery times and supportive care requirements of autologous recovery phase peripheral blood stem cell transplants, autologous bone marrow transplants and allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9: 227-284.
83. Kanz L, Brugger W. Mobilization and "ex vivo" manipulation of peripheral blood progenitor cells support of high-dose cancer therapy. En: Thomas ED, Blume KG and Forman SJ, eds. *Hematopoietic Cell Transplantation*. USA 1999, 455-468.
84. Bender J, To LB, Williams S, Schwartzberg LS. Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematother* 1992; 1: 329-334.
85. Haynes AP, Hunter A, McQuarter G. Engraftment characteristics of peripheral blood stem cells mobilised with cyclophosphamide and the delayed addition of G-CSF. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 359-363.
86. Besinger WI, Longin K, Appelbaum F et al. PB stem cells (PBSCs) collected after recombinant granulocyte colony-stimulating factor (rh G-CSF): an analysis of factors correlating with the tempo of engraftment after transplantation. *Br J Haematol* 1994; 87: 825-831.
87. Laszlo D, Galieni P, Raspadori D et al. Fludarabine containing-pautas may adversely affect peripheral stem cell collection in low-grade non-Hodgkin's lymphoma patients. *Leuk Lymphoma* 2000; 37: 157-61.
88. Haas R, Möhle R, Frühauf S et al. Patients characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. *Blood* 1994; 83: 3787-3794.
89. Olivieri A, Offidani M, Ciniero L et al. Optimization of yield of PBSC for autotransplantation mobilized by high dose chemotherapy and G-CSF: proposal for a mathematical model. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 273-278.

90. Koumakis G, Vassilomanolakis M, Hatzichristou H et al. Predictive factors affecting mobilization and peripheral blood stem cell (PBSC) collection using single leukapheresis (SA) for rescuing patients after high-dose chemotherapy (HD.CHE) in various malignancies. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18: 1065-1072.
91. McQuaker IG, Haynes AP, Stainer C et al. Stem cell mobilization in resistant or relapsed lymphoma: superior yield of progenitor cells following a salvage pauta comprising ifosfamide, etoposide and epirubicin compared to intermediate-dose cyclophosphamide. *Br J Haematol* 1997; 98: 228-233.
92. Weaver CH, Schwartzberg LS, Birch R et al. Collection of peripheral blood progenitor cells after the administration of cyclophosphamide, etoposide and granulocyte-colony-stimulating factor: an analysis of 497 patients. *Transfusion* 1997; 37: 896-903.
93. Watts MJ, Sullivan AM, Jamieson E et al. Progenitor-cell mobilization after low-dose cyclophosphamide and granulocyte-colony-stimulating factor. An analysis of progenitor -cell quantity and quality and factors predicting for these parameters in 101 pretreated patients with malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 535-546.
94. Vantelon JM, Koscielny S, Brault P. Scoring system for the prediction of successful peripheral blood stem cell (PBSC) collection in non-Hodgkin's lymphoma (NHL): application in clinical practice. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 495-499.
95. Russell NH, McQuaker G, Stainer C et al. Stem cell mobilization in lymphoproliferative diseases. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 935-940.
96. Rosenfeld CS, Shaddock RK, Zeigler ZR et al. Cyclophosphamide-mobilized peripheral blood stem cell in patients with lymphoid malignancies. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 433-438.
97. Watts MJ, Ings SJ, Leverett D, MacMillan A, Devereux S, Goldstone, Linch DC. ESHAP and G-CSF is a superior blood stem cell mobilizing compared to cyclophosphamide 1.5 g m<sup>2</sup> and G-CSF for pre-treated lymphoma patients: a matched pairs analysis of 78 patients. *Br J Cancer* 2000; 82: 278-282.
98. Olivieri A, Offidani M, Ciniero L et al. DHAP pauta plus G-CSF as salvage therapy and priming for blood progenitor cell collection in patients with poor prognosis lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 85-93.

99. Knauf WU, Koenigsmann MP, Notter M et al. Peripheral blood progenitor cell mobilization with Dexamethasone/Granulocyte Colony-Stimulating Factor, etoposide purging, and autologous transplantation after high-dose cyclophosphamide treatment: a safe and effective protocol in patients with poor risk malignant lymphomas. *Leuk Lymphoma* 1996; 23:305-311.
100. Weaver CH, Zhen B, Buckner CD. Treatment of patients with malignant lymphoma with Mini-BEAM reduces the yield of CD34+ peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 1169-1170.
101. McQuaker IG, Haynes AP, Stainer C, Byrne JL, Russell NH. Mobilization of peripheral blood stem cells with filgrastim and G-CSF improves CD34+ cell yields and engraftment in patients with non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 715-722.
102. Reiser M, Josting A, Draube A et al. Successful peripheral blood stem cell mobilization with etoposide (VP-16) in patients with relapsed or resistant lymphoma who failed cyclophosphamide mobilization. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 1223-1228.
103. Moskowitz CH, Bertino JR, Golassman JR et al. Ifosfamide, Carboplatin and Etoposide: a highly effective cytoreduction and peripheral-blood progenitor-cell mobilization protocol for transplant-eligible patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3776-3785.
104. Apostolidis J, Foran JM, Johnson PWM et al. Patterns of outcome following recurrence after myeloablative therapy with autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 1999;17: 216-221.
105. Friedberg JW, Freedman AS. High-dose therapy and stem cell transplantation in follicular lymphoma. *Ann Hematol* 1999; 78: 203-211.
106. Negrin RS, Pesendo J. Detection of tumor cells in purged bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by polymerase chain reaction amplification of bcl-2 translocation. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1021-1027.
107. Benjamin D, Magrath IT, Douglass EC, Corash LM. Derivation of lymphoma cell lines from microscopically normal bone marrow in patients with undifferentiated lymphoma: evidence of occult bone marrow involvement. *Blood* 1983; 61: 1017-1019.

108. Yuan R, Dowling P, Zucca E et al. Detection of bcl-2/JH rearrangement in follicular and diffuse lymphoma: concordant results of peripheral blood and bone marrow analysis at diagnosis. *Br J Cancer* 1993; 67: 922-925.
109. Corradini P, Astolfi M, Cherasco C et al. Molecular monitoring of minimal residual disease in follicular and mantle cells non-Hodgkin's lymphomas treated with high-dose chemotherapy and peripheral blood progenitor cell autografting. *Blood* 1997; 2: 724-731.
110. Leonard BM, Héту F, Busque L et al. Lymphoma cell burden in progenitor cell grafts measured by competitive polymerase chain reaction: less than one log difference between bone marrow and peripheral blood source. *Blood* 1998; 91: 331-339.
111. Brenner MK, Rill DR, Moen RC et al. Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation. *Lancet* 1993; 341: 85-86.
112. Deisseroth A, Zu Z, Claxton D et al. Genetic marking shows that Ph<sup>+</sup> cells present in autologous transplants in chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow in CML. *Blood* 1994; 83: 3068-3076.
113. Gribben JG, Neuberg D, Freedman AS et al. Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl-2 translocation is associated with increased risk of relapse after autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *Blood* 1993; 81: 3449-3453.
114. Bulabois CE, Milpied N, Mahe B et al. Purged or unpurged autologous stem cell transplantation for 66 patients with follicular lymphomas: a single center experience. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21 (Supl 1): 169.
115. Williams CD, Goldstone AH, Pearce RM et al. Purging of bone marrow in autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma: a case-matched comparison with unpurged cases by the European Blood and Marrow Transplant Lymphoma Registry. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2454-64.
116. Uckun FM, Gajl-Peczalska K, Meyers DE et al. Marrow purging in autologous transplantation for T-lineage acute lymphoblastic leukemia: efficacy of "ex vivo" treatment with immunotoxins and 4-hydroperoxycyclophosphamide against fresh leukemic marrow progenitor cells. *Blood* 1987; 69: 361-366.

117. Canals C, Torrico C, Picón M et al. Immunomagnetic bone marrow purging in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Hematother* 1997; 6: 261-268.
118. Treleaven JG, Gibson FM, Ugelstad J et al. Removal of neuroblastoma cells from bone marrow with monoclonal antibodies conjugated to magnetic microspheres. *Lancet* 1984; 14: 70-73.
119. Gribben JG, Saporito L, Barber M et al. Bone marrow of non-Hodgkin's lymphoma patients with a bcl-2 translocation can be purged of polymerase chain reaction-detectable lymphoma cells using monoclonal antibodies and immunomagnetic bead depletion. *Blood* 1992; 80: 1083-1089.
120. Shimazaki C, Wisniewski D, Scheinberg DA et al. Elimination of myeloma cells from bone marrow by using monoclonal antibodies and immunomagnetic immunobeads. *Blood* 1998; 72: 1248-1254.
121. Shpall EJ, Bast RC, Joines WT et al. Immunopurging of breast cancer from bone marrow for autologous transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1991; 7: 141-151.
122. Kvalheim G, Sorensen O, Fodstad O et al. Immunomagnetic removal of B-lymphoma cells from human bone marrow: A procedure for clinical use. *Bone Marrow Transplant* 1988; 3: 31-41.
123. Kvalheim G, Wang MY, Pharo A et al. Purging of tumor cells from leukapheresis products: experimental and clinical aspects. *J Hematother* 1996; 5: 427-436.
124. García J, Puntí C, Picón M et al. Bone marrow purging in acute lymphoblastic leukemia: biological and clinical features. *J Hematother* 1994; 3: 203-211.
125. Martín-Henao GA, Picón M, Limón A et al. Immunomagnetic bone marrow (BM) and peripheral blood progenitor cell (PBPC) purging in follicular lymphoma (FL). *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 579-587.
126. Hurd DD, LeBien TW, Lasky LC et al. Autologous bone marrow transplantation in non-Hodgkin's lymphoma: monoclonal antibodies plus complement for "ex vivo" marrow treatment. *Am J Med* 1988; 85: 829-834.
127. Brugger W, Henschler R, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R and Kanz L. Positively selected autologous blood CD34+ cells and unseparated peripheral blood progenitor cells mediate identical hematopoietic engraftment after high-dose VP-16, ifosfamide carboplatin and epirubicin. *Blood* 1994; 84:1421.

128. Voso MT, Hoaus S, Moos M, Haas R. Lack of t(14;18) polymerase chain reaction-positive cells in highly purified CD34+ cells and their CD19 subsets in patients with follicular lymphoma. *Blood* 1997; 89: 3763-3768.
129. Altés A, Sierra J, Esteve J et al. CD34+-enriched-CD19+-depleted autologous tperipheral blood stem cell transplantation for chronic lymphoproliferative disorders: high purging efficiency but increased risk of severe infections. *Exp Hematol* 2002; 30: 824-830.
130. Horning SJ. High-dose therapy and transplantation for low-grade lymphoma. *Hematol Oncol Clin N Am* 1997; 11: 919-35.
131. Freedman AS, Neuberg D, Mauch P et al. Long-term follow-up of autologous bone marrow transplantation in patients with relapsed follicular lymphoma. *Blood* 1999; 94: 3325-3333.
132. Apostolidis J, Gupta RK, Grenzeliás D et al High-dose therapy with autologous bone marrow support as consolidation of remission in follicular lymphoma: long-term clinical and molecular follow-up. *J Clin Oncol* 18: 527-536.
133. Rohatiner AZS, Johnson PWM, Price CGA et al. Myeloablative therapy with autologous bone marrow transplantation as consolidation therapy for recurrent follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1177-84.
134. Bierman JP, Vose JM, Anderson JR, Bishop MR, Kessinger A, Armitage JO. High-dose therapy with autologous hematopoietic rescue for follicular low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 445-50.
135. Bastion Y, Brice P, Haioun C et al. Intensive therapy with peripheral blood progenitor cell transplantation in 60 patients with poor prognosis follicular lymphoma. *Blood* 1995; 86: 3257-62.
136. Foran J, Apostolidis J, Papamichael D et al. High-dose therapy with autologous haematopoietic support in patients with transformed follicular lymphoma: a study of 27 cases from a single centre. *Ann Oncol* 1998; 9: 865-869.
137. Frieberg JW, Neuberg D, Gribben JG, et al Autologous bone marrow transplantation after histologic transformation of indolent B cell malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999; 5: 262-268.

138. Berglund A, Enblad G, Carlson K, Glimelius B y Hagberg H. Long-term follow-up of autologous stem-cell transplantation for follicular and transformed follicular lymphoma. *Eur J Haematol* 2000; 65: 17-22.
139. Williams CD, Harrison CN, Lister TA et al. High-dose therapy and autologous stem-cell support for chemosensitive transformed low-grade follicular non-Hodgkin's lymphoma: a case matched study from the European Bone Marrow Transplant registry. *J Clin Oncol* 2001;19: 727-735.
140. Freedman AS, Gribben JG, Neuberger D et al. High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation in patients with follicular lymphoma during first remission. *Blood* 1996; 88: 2780-2786.
141. Tarella C, Caracciolo D, Corradini P et al. Long-term follow-up of advanced-stage low-grade lymphoma patients treated upfront with high-dose sequential chemotherapy and autograft. *Leukemia* 2000; 14: 740-747.
142. Horning SJ, Negrin RS, Hoppe RT et al. High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma in first complete or partial remission: results of a phase II clinical trial. *Blood* 2001; 97: 404-409.
143. Hass R, Moos M, Mühle R et al. High-dose therapy with peripheral blood progenitor cell transplantation in low-grade non-Hodgkin's-lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 149-155.
144. Morel P, Laporte JP, Noel MP et al. Autologous bone marrow transplantation as consolidation therapy may prolong remission in newly diagnosed high-risk follicular lymphoma: A pilot study of 34 cases. *Leukemia* 1995; 9: 576-582.
145. Colombat Ph, Donadio D, Fouillard L et al. Value of autologous bone marrow transplantation in follicular lymphoma: A France Autogreffe retrospective study of 42 patients. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13: 157-162.
146. Cervantes F, Shu XO, McGlave P et al. Autologous marrow transplantation for non-transformed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 387-392.
147. Darrington DL, Vose JM, Anderson JR et al. Incidence and characterization of secondary myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia following high-dose



- chemoradiotherapy and autologous stem cell transplantation for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol* 1994; 12: 2527-2534.
148. Miller JS, Arthur DC, Litz CE, Neglia JP, Miller WJ, Weisdorf DJ. Myelodysplastic syndrome after autologous bone marrow transplantation: An additional late complication of curative cancer therapy. *Blood* 1994; 83: 3780-3786.
149. Stone RM, Neuberg D, Soiffer R et al. Myelodysplastic syndrome as a late complication following autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1994; 12: 2535-2542
150. Milligan DW, Ruiz De Elvira MC, Kolb HJ et al. Secondary leukemia and myelodysplasia after autografting for lymphoma: results from the EBMT. *Br J Hematol* 1999; 106: 1020-1026.
151. Micallef IN, Lillington DM, Apostolidis J et al. Therapy related myelodysplasia and secondary acute myelogenous leukemia after high-dose therapy with autologous hematopoietic progenitor-cell support for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol* 2000; 18: 947-955.
152. Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK and Christiansen DH. Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplasia after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Blood* 2000; 95: 3273-3279.
153. van Besien K. Allogeneic transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 1999; 84 (Supl 10): 47-50.
154. Champlin, R, Khouri I, van Besien K. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia and lymphoma. En: Thomas ED, Blume KG and Forman SJ, eds. *Hematopoietic Cell Transplantation*. USA 1999, 892-903.
155. Sullivan KM, Storb R, Buckner CD et al. Graft-versus-host-disease as adoptive immunotherapy in patients with advanced hematologic neoplasm. *N Engl J Med* 1989; 313: 828-834.
156. Van Besien KW, De Lima M, Giralt S et al. Management of lymphoma recurrence after allogeneic transplantation: the relevance of graft-versus-lymphoma effect. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 977-982.
157. van Besien K, Sobocinski KA, Rowlings PA et al. Allogeneic bone marrow transplantation for low-grade lymphoma. *Blood* 1998; 92: 1832-1836.

158. Peniket AJ, Ruiz de Elvira MC, Taghipour G et al. Allogeneic transplantation for lymphoma produces a lower relapse rate than autologous transplantation but survival has not risen because of higher treatment-related mortality. A report of 764 cases from the EBMT lymphoma registry. *Blood* 1997; 90 (Supl. 1): 255 a.
159. Attal M, Socié G, Molina L et al. Allogeneic bone marrow transplantation for refractory and recurrent follicular lymphoma: a case-matched analysis with autologous transplantation from the French Bone Marrow Transplant Group registry data. *Blood* 1997; 90 (Supl. 1): 255 a.
160. Verdonck LF, Dekker AW, Lokhorst HM, Petersen EJ, Nieuwenhuis HK. Allogeneic versus autologous bone marrow transplantation for refractory and recurrent low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90: 4201-4205.
161. Verdonck LF. Allogeneic versus autologous bone marrow transplantation for refractory and recurrent low-grade non-Hodgkin's lymphoma: update results of the Utrecht experience. *Leuk Lymphoma* 1999; 34: 129-136.
162. Chopra R, Goldstone AH, Pearce R et al. Autologous versus allogeneic bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma: a case controlled analysis of the European Bone Marrow Transplant Group registry data. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1690-1695.
163. van Besien KW, Khouri IF, Giralt S et al. Allogeneic transplantation for refractory and recurrent low-grade lymphoma: the case for aggressive management. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1096-1102.
164. Van Besien K, Khouri I, Champlin R, McCarthy P. Allogeneic transplantation for low-grade lymphoma: long-term follow-up. *J Clin Oncol* 2000; 18: 702.
165. Martínez C, Martino R, Brunet S et al. Allogeneic stem cell transplantation for advanced low-grade lymphoproliferative disorders: report of six cases. *Haematologica* 1996; 81: 330-334.
166. López R, Martino R, Brunet S, Sierra J. Autologous or allogeneic stem cell transplantation in advanced low-grade lymphomas?. *Blood* 1998; 91: 4810.
167. Dreger P, Schmitz N. Allogeneic transplantation of peripheral blood stem cells. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999; 12: 261-278.
168. Hunault-Berger M, Ifrah N, Solal-Celigny P. Intensive therapies in follicular non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2002; 100: 1141-1152.

169. Juckett M, Rowlings P, Hessner M et al. T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation for high-risk non-Hodgkin's lymphoma: clinical and molecular follow-up. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 893-899.
170. Mandingers CM, Raemaekers JM, Schattenberg AV et al. Allogeneic bone marrow transplantation with T-cell-depleted marrow grafts for patients with poor-risk relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 1998; 100: 198-206.
171. Bellido M, Sureda A, Martino R, Madoz P, García J, Brunet S. Collection of peripheral cells for autografting with low-dose cyclophosphamide plus granulocyte colony-stimulating factor. *Haematologica* 1998; 83: 428-431.
172. Armitage S, Hargreaves R, Samson D et al. CD34 counts to predict the adequate collection of peripheral blood progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 587-591.
173. Engelhardt M, Winkler J, Waller C et al. Blood progenitor cell mobilization studied in multiple myeloma, solid tumor and non-Hodgkin's lymphoma patients after combination chemotherapy and G-CSF. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 529-537.
174. Díaz MA, García-Sánchez F, Lillo R et al. Large-volume leukapheresis in pediatric patients: pre-apheresis peripheral blood CD34+ cell count predicts progenitor cell yield. *Haematologica* 1999; 84: 32-35.