

I-INTRODUCCION

1. CARCINOMA DE MAMA

1.1 EPIDEMIOLOGIA

El cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en la mujer en los países industrializados. En los países latinoamericanos y africanos ocupa el segundo lugar, después del cáncer de cérvix uterino, y en los países del continente asiático es también el segundo, después del cáncer gástrico.

En 1994 se produjeron en España 5.864 fallecimientos por cáncer de mama, lo que supuso el 18,2% de todas las defunciones por cáncer en el sexo femenino y una tasa de mortalidad de 29,3 por 100.000 mujeres. Además de la mortalidad, el conocimiento de la incidencia constituye otra fuente de información sobre el impacto de las enfermedades neoplásicas en la población. En los diferentes registros del mundo las tasas de incidencia oscilan entre 90-100 nuevos casos por 100.000 habitantes/año (Hawai, Seattle) hasta cifras de 10-20 nuevos casos por 100.000 mujeres/año (Qidogen China o la población no judía residente en Israel). Las cifras en España, ajustadas a la población mundial, oscilarían entre los 50-60 nuevos casos por 100.000 mujeres/año, lo cual nos situaría a nivel mundial como un país de riesgo intermedio ¹. El número de casos nuevos estimados a nivel mundial viene a ser de 720.000 por año, cifra que representa un 20% de todos los casos de cáncer ². En un estudio realizado en Cataluña se calculó el riesgo de padecer cáncer de mama, siendo éste de 1 de cada 19 mujeres antes de los 74 años de edad ³. Los grupos de edad con mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama están entre los 60-79 años.

Factores de riesgo

Los estudios clásicos sobre los factores de riesgo para el cáncer de mama están dominados por la frecuencia elevada de casos diagnosticados en la

postmenopausia. En términos generales no existen grandes diferencias entre los factores de riesgo para el cáncer de mama pre y postmenopáusico y la magnitud de los riesgos observados son bajos (OR = 1,5-2,5).

Los antecedentes familiares y el cáncer de mama premenopáusico

Uno de los factores de riesgo más consistente para desarrollar cáncer de mama es la presencia de antecedentes familiares directos de cáncer de mama ⁴. En ocasiones, estos antecedentes reflejan un componente hereditario. Desde el punto de vista clínico, la probabilidad de estar delante de una predisposición hereditaria se relaciona con la edad joven del caso, con la edad joven del antecedente familiar, con el número y parentesco de los familiares afectados, con la bilateralidad del tumor, y con la asociación en la familia o en la paciente, de cáncer de ovario, colon, endometrio, sarcomas y más recientemente descrito, de cáncer de próstata ⁵.

Alteraciones genéticas y cáncer de mama

Entre un 5-10% de cáncer de mama revela una herencia mendeliana simple y compatible con una transmisión autosómica dominante de uno o varios genes mayores de predisposición al cáncer de mama de fuerte penetrancia. La frecuencia de este/os gen/es en la población se estima en un 50% a los 50 años y en un 90% a los 80 años. En los países occidentales, una mujer sobre 200 es susceptible de desarrollar a lo largo de su vida un cáncer de mama de tipo hereditario, de los que la mitad se diagnosticarán antes de los 50 años.

BRCA1

Uno de los genes mayores de susceptibilidad al cáncer de mama se ha identificado en el brazo corto del cromosoma 17 locus BRCA1 ⁶ y en 1994 se

identificó la secuencia ^{7,8}. Se han descrito más de 100 mutaciones en el estudio de 200 familias con historia familiar de cáncer de mama y/u ovario. De particular interés es la mutación 185 del AG que se ha identificado en mujeres de origen judío con fuerte historia familiar de cáncer de mama y/o de ovario. El BRCA1 estaría implicado en un 50% de los síndromes hereditarios que incluyen cánceres de mama con fuerte historia familiar de cáncer de mama y ovario y en cerca del 75% de los síndromes hereditarios que cursan con cánceres de mama y cánceres de ovario. En conjunto, el BRCA1 estaría asociado a un 5% de los casos de cáncer de mama en mujeres de menos de 50 años y en 1% de los casos postmenopáusicos. La penetrancia de BRCA1 es importante. La probabilidad estimada de cáncer de mama a los 50 años entre las portadoras se estima en un 50% y de un 71% a los 70 años. La probabilidad de desarrollar un cáncer de ovario es del 40% a los 70 años. En mujeres jóvenes de menos de 30 años con cáncer de mama, se estima que el cáncer de mama sería atribuible a mutaciones del gen BRCA1 germinal en un 7,5%. Esta proporción ascendería a 38% en mujeres de origen judío. Es interesante observar que las mujeres con mutaciones en el gen BRCA1 no siempre tienen una historia familiar de cáncer de mama o de ovario evidente. En el estado actual de conocimientos, la mayor parte de la información sobre BRCA1 proviene de estudios de familias en las que se identificaron múltiples casos de cáncer de mama y de cáncer de ovario.

Recientemente se han publicado estudios en poblaciones de origen judío residentes en los Estados Unidos. Globalmente tanto los estudios de familias seleccionadas como los de la población judía no son extensibles a la población general. Estas familias son excepcionales y en la mayoría de los casos el cáncer de mama familiar identifica familias con dos o tres casos. En estas familias el rol BRCA1 es más difícil de establecer y evaluar.

BRCA2

Un segundo gen mayor de predisposición al cáncer de mama fue descrito e identificado como BRCA2 en el brazo largo del cromosoma 13 en 13q12-13⁹. Este último sería responsable de una parte importante de los síndromes hereditarios del cáncer de mama no relacionados al BRCA1 y estaría implicado en síndromes hereditarios que incluyen cáncer de mama masculino. La implicación de BRCA2 en el cáncer de ovario es menor que la de BRCA1. La penetrancia del gen parece ser tan importante como para el BRCA1 y se estima un riesgo acumulado para el cáncer de mama del 87% a los 80 años entre las mujeres portadoras¹⁰. Entre BRCA1 y BRCA2 deberían explicarse la mayoría de los síndromes familiares que cursan con cáncer de mama precoz y cáncer de mama/ovario.

Otros marcadores genéticos

Se conocen otros genes de susceptibilidad para el cáncer de mama con carácter hereditario que se expresan raramente en las familias con un fuerte componente hereditario pero que por el contrario podrían explicar algunos casos de cánceres de mama esporádicos, en especial los cánceres de mama precoces (<50 años). El gen supresor de tumores p53 está situado en el cromosoma 17 y es uno de los genes supresores de tumores más conocidos¹¹. Está mutado en cerca del 50% de los casos con síndrome de Li-Fraumeni completo o incompleto. Las mujeres portadoras de una mutación en p53 presentan un riesgo elevado de cáncer de mama (55% a los 50 años) pero la prevalencia de este síndrome es rara. La mutación de p53 intervendría en menos de un 5% de los cánceres de mama familiares y en menos del 1% de los cánceres de mama premenopáusicos. El gen AT de la ataxia-telangiectasia en el brazo largo del cromosoma 11 y el gen Hras1 en el brazo corto del cromosoma 11, son genes menos conocidos en relación al cáncer de mama^{12,13}. La prevalencia en la población general es

superior a la del p53 o BRCA1 (1%-2% para el gen de AT y 5% para ciertos alelos del HRAS1), pero la penetrancia, el riesgo de neoplasia de una mujer portadora, es inferior. Las implicaciones de estos genes en el cáncer de mama y la cuantificación de su importancia relativa son temas todavía en fase de investigación. Durante la progresión maligna del cáncer de mama, hasta su estadio de diseminación metastásica, pueden ocurrir mutaciones, inactivaciones, pérdida o disregulaciones de genes supresores. El gen del retinoblastoma (Rb-1 en 13q14) está mutado en el 20% de los casos. Un gen supresor de metástasis con actividad NDP-cinasa, denominado nm23, no parece estar mutado, pero su expresión está disminuida en el cáncer de mama metastásico.

1.2 DIAGNOSTICO DEL CANCER DE MAMA

Clínica y diagnóstico

Ante una tumoración mamaria, aunque existan diversas formas anatomopatológicas de presentación, hay que distinguir tres patologías fundamentales: la mastopatía quística, el carcinoma y el fibroadenoma. En cifras absolutas, la tumoración mamaria de mayor frecuencia es la mastopatía quística (grandes o pequeños quistes, varios o únicos), seguida del carcinoma, y como tercera más frecuente el fibroadenoma. Si a esto añadimos que, en general, el fibroadenoma se presenta en las edades más jóvenes (15-30 años), que la mastopatía posee su máxima incidencia en el período premenopáusico (35-50 años), y que el carcinoma aparece tanto en la premenopausia como en la posmenopausia (35-75 años), si se conoce la edad de la paciente tendremos una idea de probabilidad diagnóstica ante un tumor mamario.

Sintomatología: Por lo general la tumoración es el único signo en los tumores benignos. Del mismo modo, es el dato más frecuente observado en los carcinomas, que casi siempre se presentan sin otra sintomatología local. El dolor

que acompaña a la tumoración es muy frecuente en la mastopatía quística y se relaciona de modo típico con el período menstrual. La secreción por el pezón es más frecuente en los tumores benignos, sobre todo en los papilomas intraductales. Aunque es más rara en el carcinoma, sin embargo es muy orientativa de su naturaleza, cuando ésta es de características rosadas o sanguinolentas.

A menudo, existen otros síntomas que acompañan a las tumoraciones malignas, tales como la retracción de la piel que traduce el crecimiento de la masa inicial, cuando altera y distorsiona la estructura de los ligamentos de Cooper. Si el crecimiento continúa, se operan cambios en la situación del pezón y areola con invaginación, eversión y aumento de la retracción de la piel. Si la lesión progresa, la masa tumoral se manifiesta de forma evidente, ocasionando severas retracciones y deformidades de la masa, con ulceración de la piel y aparición de nódulos satélites de infiltración subcutánea. En este curso evolutivo, es posible que surja afectación de los ganglios regionales por extensión a través de las vías de drenaje hacia la axila o ganglios de la cadena mamaria interna, y la invasión vascular con diseminación hematológica y riesgo de implantes metastásicos en cualquier órgano de la economía.

Cuando se sospecha la posibilidad de una neoplasia mamaria, sea por un hallazgo a través del autoexamen, sea por la presencia de signos o síntomas sospechosos, o bien en aquellos casos en que además de un síntoma la probabilidad de padecer una neoplasia es mayor, la sistemática a seguir conlleva la práctica de una exploración clínica cuidadosa, la realización de estudios radiográficos mediante mamografía es imprescindible para establecer los criterios de malignidad y benignidad, complementándose con la utilización de ecografía. Últimamente parecen ser interesantes los estudios con resonancia nuclear magnética. La punción y la citología son de gran valor y la anatomía patológica culmina, confirmando el diagnóstico.

Patología del cáncer de mama. Formas anatomopatológicas

El examen histopatológico del cáncer de mama hace posible el diagnóstico de la lesión, ayuda a determinar el pronóstico del paciente. Existen muchas clasificaciones patológicas. Las más comúnmente utilizadas son las presentadas por el Instituto de las Fuerzas Armadas (AFIP) y la Organización Mundial de la Salud. La mayor parte de las neoplasias de mama se originan en el epitelio de los conductos galactóforos (carcinomas ductales, 90%) y los restantes se forman en estructuras acinares de los lobulillos mamarios (carcinomas lobulillares, 10%). Ambos grupos presentan variedades infiltrantes y no infiltrantes

Carcinoma in situ

El carcinoma in situ se clasifica en ductal o lobular dependiendo de las características citológicas y el patrón de crecimiento. El carcinoma ductal in situ también conocido como carcinoma intraductal, y el carcinoma lobular in situ se caracterizan por la proliferación de células epiteliales malignas limitada a los conductos mamarios o a los lóbulos, sin evidencia microscópica de invasión a través de la membrana basal. En la actualidad es importante diferenciar los carcinomas intraductales en dos grandes grupos: carcinoma intraductal de alto grado citológico (comedocarcinoma) y carcinoma intraductal de bajo grado citológico (no comedocarcinoma). Los carcinomas de alto grado citológico expresan con frecuencia marcadores biológicos de mal pronóstico, al contrario de lo que ocurre con los carcinomas intraductales de bajo grado. Los carcinomas intraductales de bajo grado se clasifican según el patrón arquitectural predominante:

- Cribiforme.
- Papilar
- Sólido

Carcinomas infiltrantes

Carcinoma ductal. Supone el 70% de los casos de cáncer de mama. Se caracteriza por la consistencia pétreo a la palpación. Metastatizan en los ganglios axilares y son los de peor pronóstico.

Carcinoma medular. Esta variedad histológica posee bajas posibilidades infiltrativas. Constituyen 5%-7% de todos los carcinomas mamarios y se caracteriza por tener unos bordes bien circunscritos, núcleo pobremente diferenciado, y una intensa infiltración con pequeños linfocitos y células plasmáticas.

Carcinoma tubular. Un tumor en el cual la formación de túbulos es evidente es conocido como carcinoma tubular bien diferenciado. Este diagnóstico es hecho sólo si el 75% o más del tumor está compuesto por estos elementos. Las metástasis axilares son infrecuentes, y el pronóstico es considerablemente mejor que en el caso del carcinoma ductales.

Carcinoma mucinoso. El carcinoma mucinoso o coloide supone aproximadamente el 3% de todos los carcinomas mamarios. Es de crecimiento lento y puede alcanzar grandes proporciones. Cuando el tumor es predominantemente mucinoso, el pronóstico suele ser bueno.

Carcinoma lobular infiltrante. Es relativamente poco frecuente, supone alrededor del 5-10% de los tumores de mama. La presentación clínica es a menudo un área densa mal definida en la mama. Microscópicamente se compone de pequeñas células colocadas en línea con tendencia al crecimiento alrededor de los ductos y lóbulos. Se caracteriza por las grandes proporciones de tumores

multicéntricos. El carcinoma lobular infiltrante tiene las mismas posibilidades de infiltración ganglionar axilar que el carcinoma ductal.

Comedocarcinoma infiltrante. El comedocarcinoma infiltrante es un tipo de carcinoma ductal infiltrante. Se compone primariamente de tipo comedo o carcinoma ductal in situ, el cual se caracteriza por una pobre diferenciación con frecuentes mitosis y necrosis central con áreas de invasión.

Enfermedad de Paget. La enfermedad de Paget de la mama ocurre en 1% de todas las pacientes con cáncer de mama. Clínicamente, las pacientes presentan una larga historia de cambios eczematosos en el pezón con prurito, quemazón y sangrado. Los cambios en el pezón se asocian con un carcinoma subyacente en la mama que puede ser palpado en la mitad de los casos. El pronóstico está relacionado con la variedad histológica del tumor asociado. Histológicamente, la epidermis del pezón contiene células tumorales.

Carcinoma inflamatorio de la mama. Se caracteriza clínicamente por edema de la piel de la mama rojez, calor, induración del tejido subyacente. En aproximadamente la mitad de las pacientes no es palpable la masa. Células inflamatorias raramente están presentes. El pronóstico de las pacientes con carcinoma inflamatorio es malo aunque la enfermedad esté aparentemente localizada.

1.3 CLASIFICACIÓN TNM

Este sistema de clasificación proporciona una estrategia para agrupar los pacientes con respecto a su pronóstico. Las decisiones terapéuticas se formulan en parte de acuerdo con las categorías del sistema de clasificación, pero principalmente de acuerdo al tamaño del tumor, estado de los ganglios linfáticos,

los niveles de los receptores de estrógeno y progesterona en el tejido tumoral, el estado menopáusico y la salud general de la paciente.

El AJCC ha designado los estadios mediante la clasificación TNM ¹⁴. Este sistema se modificó en el año 2002 ¹⁵. La clasificación 2002 considera algunas de las categorías como estadio III las cuales anteriormente se consideraron estadio II. Se ha hecho notar que, como resultado del fenómeno de "migración de estadio", esto quiere decir que la supervivencia por estadio de series de casos clasificados por el nuevo sistema parecerá superior a aquellos que usan el viejo sistema¹⁶.

Definiciones TNM

Las definiciones para la clasificación del tumor primario (T) son las mismas tanto para la clasificación clínica como para la patológica. Si la medida se hace mediante un examen físico, el examinador usará los títulos principales (T1, T2, o T3). Si se usan otras medidas, como las medidas mamográficas o patológicas, se puede usar el subconjunto de T1. Los tumores se deben medir al incremento más cercano a 0,1 cm.

Tumor primario (T)

TX: El tumor primario no puede ser evaluado

T0: No hay prueba de tumor primario

Tis: Carcinoma intraductal, carcinoma lobular in situ o enfermedad de Paget del pezón sin infiltración del tejido de mama normal

Tis (DCIS): Carcinoma ductal in situ

Tis (LCIS): Carcinoma lobular in situ

Tis (Paget): Enfermedad de Paget del pezón sin tumor. [Nota: La enfermedad de Paget relacionada con un tumor se clasifica según el tamaño del tumor.]

T1: Tumor menor o igual a 2,0 cm en su mayor dimensión

T1mic: Microinvasión menor o igual a 0,1 cm en su mayor dimensión

T1a: Tumor >0,1 cm pero menor o igual a 0,5 cm en su mayor dimensión

T1b: Tumor >0,5 cm pero menor o igual a 1,0 cm en su mayor dimensión

T1c: Tumor >1,0 cm pero menor o igual a 2,0 cm en su mayor dimensión

T2: Tumor >2,0 cm pero menor o igual a 5,0 cm en su mayor dimensión

T3: Tumor mide >5,0 cm en su mayor dimensión

T4: Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a (a) la pared torácica o (b) la piel, sólo como se describe a continuación

T4a: Extensión a la pared torácica, sin incluir el músculo pectoral

T4b: Edema (incluso piel de naranja), o ulceración de la piel del seno o nódulos satélites de la piel limitados al mismo seno

T4c: Ambos casos T4a y T4b

T4d: Carcinoma inflamatorio

Ganglios linfáticos regionales (N). Clasificación Clínica (cN)

NX: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales (por ejemplo, fueron extraídos previamente)

N0: No hay metástasis regional de los ganglios linfáticos

N1: Metástasis a ganglio o ganglios linfáticos axilares ipsilaterales móviles

N2: Metástasis a ganglio o ganglios linfáticos ipsilaterales fijos o emparejados, o en nódulos mamarios internos ipsilaterales clínicamente aparente* en la ausencia de metástasis de ganglios linfáticos clínicamente evidentes

N2a: Metástasis en los ganglios linfáticos axilares ipsilaterales unidos uno con el otro (emparejados) o con otras estructuras

N2b: Metástasis solamente en nódulos mamarios internos ipsilaterales clínicamente aparente* en la ausencia de metástasis de ganglios linfáticos clínicamente evidentes

N3: Metástasis en nódulo(s) linfático(s) infraclavicular(es) ipsilateral(es) con implicación de nódulo linfático axilar o sin este, o en nódulo(s) mamario(s) interno(s) ipsilateral(es) clínicamente aparente* en la presencia de metástasis de ganglios linfáticos axilares clínicamente evidentes o metástasis en nódulo(s) linfático(s) supraclavicular(es) ipsilateral(es) con implicación de ganglios linfáticos mamaros axilares o internos, o sin ella

N3a: Metástasis en ganglio(s) linfático(s) infraclavicular(es) ipsilateral(es)

N3b: Metástasis en ganglios linfáticos mamaros internos ipsilaterales y ganglios linfáticos axilares

N3c: Metástasis en ganglio(s) linfático(s) supraclavicular(es) ipsilateral(es)

* [Nota: Clínicamente aparente se define como la detección mediante estudios de imagen (excluyendo la linfoscintigrafía) o por examen clínico o si es marcadamente visible su forma patológica.]

Clasificación patológica (pN)*

pNX: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales (por ejemplo, no se extrajeron para estudio patológico o se extrajeron anteriormente)

pN0: No hay metástasis a los ganglios linfáticos regionales histológicamente, sin examen adicional de células tumorales aisladas (ITC, por sus siglas en inglés)

[Nota: Las células tumorales aisladas (ITCs, por sus siglas en inglés) se definen como células tumorales únicas o agrupaciones de células pequeñas $\leq 0,2$ mm, que generalmente se detectan solo mediante métodos inmunohistoquímicos (IHC, por sus siglas en inglés) o métodos moleculares pero que pueden ser verificados por tinciones H&E. Generalmente las ITCLs no muestran prueba de actividad maligna, por ejemplo, proliferación o reacción estromal.]

pN0 (I-): No hay metástasis a los ganglios linfáticos regionales histológicamente, IHC negativo

pN0 (I+): No hay metástasis a los ganglios linfáticos regionales histológicamente, IHC positivo, no hay agrupación de IHC > 0,2 mm

pN0 (mol-): No hay metástasis a los ganglios linfáticos regionales histológicamente, hallazgos moleculares negativos (RT-PCR, por sus siglas en inglés) **

pN0 (mol+): No hay metástasis a los ganglios linfáticos regionales histológicamente, hallazgos moleculares positivos (RT-PCR) **

* [Nota: La clasificación se basa en la disección de ganglios linfáticos axilares con disección de ganglios linfáticos centinela o sin ellos. La clasificación basada únicamente en la disección de ganglios linfáticos centinela sin disección de ganglios linfáticos axilares posteriores se designa (sn) para "ganglio centinela", por ejemplo, pN0 (I+) (sn).]

** [Nota: RT-PCR, por sus siglas en inglés: Reacción en cadena de polimerasa/transcriptasa inversa.]

pN1: Metástasis de 1 a 3 ganglios linfáticos axilares, o nódulos mamarios internos con enfermedad microscópica detectada mediante disección de ganglios linfáticos centinela pero que no son clínicamente aparente**

pN1mi: Micrometástasis (>0,2 mm, pero ≤2,0 mm)

pN1a: Metástasis de 1 a 3 ganglios linfáticos axilares

pN1b: Metástasis en ganglios mamarios internos con enfermedad microscópica detectada mediante la disección de ganglios linfáticos centinela pero que no es clínicamente aparente**

pN1c: Metástasis de 1 a 3 ganglios linfáticos axilares y en los ganglios linfáticos mamarios internos con enfermedad microscópica detectada mediante la disección de ganglios linfáticos centinelas pero que no son clínicamente aparentes.** (Si se relaciona > 3 ganglios linfáticos mamarios internos positivos, los ganglios mamarios internos se clasifican como pN3b para reflejar un aumento en la masa tumoral)

pN2: Metástasis de 4 a 9 ganglios linfáticos axilares, o en ganglios linfáticos mamarios internos clínicamente aparentes** en la ausencia metástasis de ganglios

linfáticos axilares a ganglio o ganglios linfáticos axilares ipsilaterales unidos entre sí o a otras estructuras

pN2a: Metástasis de 4 a 9 ganglios linfáticos axilares (por lo menos un depósito tumoral > 2,0 mm)

pN2b: Metástasis de ganglios linfáticos mamarios internos clínicamente aparentes en la ausencia de metástasis de ganglios linfáticos axilares

pN3: Metástasis en 10 o más ganglios linfáticos axilares, o en ganglios linfáticos infraclaviculares, o en ganglios linfáticos mamarios ipsilaterales clínicamente aparentes* en la presencia de 1 o más ganglios linfáticos axilares positivos; o en más de 3 ganglios linfáticos axilares con metástasis microscópica clínicamente negativa en los ganglios linfáticos mamarios internos, o en ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales

pN3a: Metástasis en 10 o más ganglios linfáticos axilares (por lo menos un depósito tumoral > 2,0 mm), o metástasis a los ganglios linfáticos infraclaviculares

pN3b: Metástasis de ganglios linfáticos mamarios ipsilaterales clínicamente aparentes en la presencia de 1 o más ganglios linfáticos axilares positivos; o en más de 3 ganglios linfáticos axilares y en los ganglios linfáticos mamarios internos con enfermedad microscópica detectada mediante la disección de ganglios linfáticos centinela pero que no es clínicamente aparente.

pN3c: Metástasis en ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales

* [Nota: Clínicamente aparente se define se detecte en estudios de imagen o mediante un examen clínico.]

Metástasis a distancia (M)

MX: No se puede evaluar la presencia de metástasis a distancia

M0: No hay metástasis a distancia

M1: Presencia de metástasis a distancia

Agrupación por estadios del AJCC

Estadio 0

Tis, N0, M0

Estadio I

T1,* N0, M0

Estadio IIA

T0, N1, M0

T1,* N1, M0

T2, N0, M0

Estadio IIB

T2, N1, M0

T3, N0, M0

Estadio IIIA

T0, N2, M0

T1,* N2, M0

T2, N2, M0

T3, N1, M0

T3, N2, M0

Estadio IIIB

T4, N0, M0

T4, N1, M0

T4, N2, M0

Estadio IIIC

Cualquier T, N3, M0

Estadio IV

Cualquier T, cualquier N, M1

* [Nota: T1 incluye T1mic]

1.4 TRATAMIENTO

1.4.1 QUIRURGICO

El tratamiento quirúrgico del cáncer de mama se debate entre una doble inducción quirúrgica: tratamiento conservador frente a mastectomía radical modificada.

Las indicaciones del tratamiento conservador las resumimos a continuación:

a) Deseo de la enferma: el cirujano no puede ni debe querer más ni menos la mama de la paciente que ella misma. Debe informarse adecuadamente de las ventajas y riesgos.

b) Necesidad de medios: es decir fácil acceso de un servicio de Radioterapia que complete el tratamiento en el tiempo adecuado. Igualmente recogemos las indicaciones sociales asegurando un correcto control postoperatorio de la mama conservada. La recidiva o fracaso del tratamiento conservador no influirá en su supervivencia siempre que sea detectada con precocidad.

c) Las fundamentales indicaciones y contraindicaciones las marcará el tamaño tumoral. La relación entre el tamaño tumoral y el tamaño de la mama. Lo normal y más frecuente es que esté alrededor de 2,5-3 cm. No hay que olvidar que los márgenes deben estar libres de patología y esto aumenta el tamaño de la tumorectomía o segmentectomía. Hay que pensar siempre en la necesidad de una buena estética después de la conservación, ya que el tratamiento conservador lo debemos enfrentar a una mastectomía con reconstrucción posterior, y puede ser

mucho más satisfactorio para la enferma, y posiblemente con menos riesgos, una buena reconstrucción que una mala estética de la mama conservada.

La extirpación de los ganglios axilares en pacientes con carcinoma infiltrante de mama es un gesto quirúrgico universalmente aceptado, dado que se considera que los ganglios linfáticos de la axila, constituyen un escalón en la progresión de la enfermedad. Aunque el papel que juega la linfadenectomía axilar sigue siendo controvertido, hoy día la finalidad de la linfadenectomía tiene tres objetivos fundamentales como son aportar información pronóstica, proveer datos para la decisión acerca del tratamiento complementario y permitir el control local de la enfermedad en la axila. Por otro lado, la linfadenectomía axilar es un gesto quirúrgico no exento de morbilidad: linfedema, neuropatía, problemas locales de la herida, etc., motivo por el que han surgido diferentes posturas con respecto a la extensión de la misma.

Basados en la escasa incidencia de metástasis ganglionares en pacientes con tumores de pequeño tamaño y teniendo en cuenta la morbilidad de la linfadenectomía, se cuestiona si, en tumores pequeños con axila clínicamente libre, es necesaria la linfadenectomía tal y como hasta la actualidad se viene realizando.

Con la introducción del estudio del ganglio centinela para valoración del estado axilar en el cáncer de mama, son múltiples los trabajos que abogan por realizar esta exploración antes de efectuar la linfadenectomía axilar reglada en tumores mamarios que reúnan determinadas características clínicas. Se define como "Ganglio Centinela" el primer ganglio linfático regional que recibe la linfa de la zona donde asienta el tumor primario. Los resultados obtenidos con esta técnica y la posibilidad de evitar la morbilidad asociada a linfadenectomía en pacientes con carcinoma mamario, constituyen el motor del estudio sobre la linfadenectomía axilar limitada, en pacientes con carcinoma de mama y axila clínicamente negativa.

1.4.2 RADIOTERAPIA

Como principio fundamental creemos que la radioterapia debe estar integrada dentro de una estrategia global, definida mediante un protocolo estructurado por factores pronósticos.

CARCINOMA IN SITU

El tratamiento de las pacientes con carcinoma intraductal se basa en la historia natural de esta patología, la extensión local, las características histológicas de la lesión y las preferencias de la paciente. Entre las opciones terapéuticas más efectivas se incluyen la mastectomía y la tumorectomía seguida o no de radioterapia. En el carcinoma intraductal es especialmente importante la obtención de la pieza quirúrgica con márgenes libres con la finalidad de reducir la incidencia de recidiva local postratamiento. La disección axilar en el carcinoma intraductal no se efectúa por la baja frecuencia de afectación ganglionar en estos casos, inferior a 3-4%.

CARCINOMA DE MAMA INFILTRANTE.

La cirugía conservadora en el carcinoma de mama asociada a radioterapia fue inicialmente utilizada en los años 50 por Mustakallid y en los años 60 por Peters. Desde entonces, su utilización ha sido cada vez más frecuente habiéndose realizado, hasta la actualidad, numerosos estudios retrospectivos y prospectivos, que confirman su utilidad ¹⁷⁻²¹.

La técnica recomendada para el tratamiento conservador incluye la escisión local amplia del tumor con márgenes libres, disección ganglionar axilar de los niveles I y II (vs ganglio centinela en dependencia de las características del tumor

y experiencia del centro) y radioterapia en la misma, incluyendo o no el tratamiento de las áreas ganglionares según la afectación ganglionar. Actualmente, existen diferentes protocolos de tratamiento con radioterapia después de cirugía conservadora, con diferencias entre ellos, pero con la finalidad en común de conseguir el control local y evitar la irradiación de los tejidos sanos para reducir al mínimo los efectos secundarios.

La técnica de la radioterapia es tratar la mama completa a través de campos tangenciales interno-externo con la paciente en decúbito supino y el brazo homolateral en abducción. Se utilizan fotones de cobalto-60 o de acelerador lineal de 4-6 MV, administrándose una dosis de 45-50 Gy en el punto ICRU a dosis/sesión de 1,8 a 2 Gy, durante 4,5-5 semanas. El volumen pulmonar irradiado puede reducirse en la angulación anterior de los campos tangenciales. El pulmón subyacente incluido en el campo de irradiación está entre 1,5 cm y 3,5 cm. La utilización de filtros compensadores permite hacer más homogénea la distribución de la dosis. El resultado cosmético a largo plazo es peor a dosis/sesión más altas de 2 Gy y con dosis totales de más de 50 Gy.

La radioterapia se inicia una vez conseguida una correcta cicatrización, entre 4-6 semanas postcirugía y se puede administrar simultáneamente con el tratamiento sistémico siempre que sea CMF. En el caso de utilizar antraciclinas en el tratamiento complementario, la irradiación se deberá realizar al finalizar la quimioterapia.

1.4.3. QUIMIOTERAPIA

QUIMIOTERAPIA ADYUVANTE

El tratamiento del cáncer de mama se ha ido modificando acorde con los cambios que la ciencia ha ido incorporando en el conocimiento de la biología y desarrollo tumoral.

A lo largo de este siglo el cáncer de mama operable fue considerado como una enfermedad locorregional y toda estrategia terapéutica fue orientada hacia el control local, pensando que los ganglios linfáticos constituían una barrera defensiva frente al tumor y no una vía de metastatización, y descartando la vía hematogena como vía de diseminación tumoral. Este concepto del cáncer de mama como enfermedad local llevó a la práctica procedimientos quirúrgicos ampliamente mutilantes.

Posteriormente en la década de los años 50, las aportaciones de Fisher y cols.²² llevaron a la concepción del cáncer de mama como enfermedad sistémica al diagnóstico, con capacidad de diseminación ganglionar local y a distancia, y por vía hematogena. Estos estudios revelaron que los ganglios linfáticos regionales tenían una importancia biológica más que anatómica y que los hallazgos observados llevaban a la conclusión de que los sistemas vascular y linfático estaban tan interrelacionados que no se podían considerar como rutas independientes de diseminación neoplásica. Fisher formuló una hipótesis y propuso una base biológica para el tratamiento del cáncer de mama que era alternativa a los principios mecanicistas de la cirugía y la radioterapia (RT). Esta hipótesis consistía en considerar el cáncer de mama como una enfermedad sistémica que comprendía un complejo espectro de interrelaciones huésped-tumor, y por tanto el tratamiento locorregional extenso posiblemente conseguiría

curar sólo a una minoría de mujeres en las que no existiesen micrometástasis. El National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) inició en 1958 el primer ensayo clínico para evaluar el papel de la quimioterapia adyuvante sistémica en el cáncer de mama operable. Se administró quimioterapia con agente único perioperatoriamente, durante y tras un periodo corto de tiempo tras la cirugía, con la intención de destruir las células tumorales diseminadas como resultado de la cirugía.

Aunque los resultados del tratamiento demostraron una mejoría tanto en supervivencia libre de enfermedad (SLE) como en supervivencia global (SG) en mujeres premenopáusicas con ganglios positivos, los resultados globales fueron desalentadores, basados en las expectativas de que todas las pacientes serían curadas. Estos hallazgos proporcionaron la evidencia inicial de que la historia natural del cáncer se podría modificar con la quimioterapia adyuvante.

Al inicio de la década de los 70 comenzaron los modernos tratamientos adyuvantes sistémicos en pacientes con cáncer de mama y ganglios positivos, y durante las pasadas dos décadas se ha generado una gran información. La consistencia de los hallazgos terapéuticos ha supuesto una profunda revolución en el abordaje, manejo y evaluación del cáncer de mama.

Numerosos estudios aleatorizados y el metanálisis del Early Breast Cancer Trialists Cooperative Group (EBCTCG)²³ de Oxford han demostrado, sin lugar a dudas, que la quimioterapia sistémica postquirúrgica reduce las recurrencias y aumenta la supervivencia en prácticamente todos los subgrupos de mujeres con cáncer de mama operable. La cuantía del aumento de la supervivencia en términos absolutos varía entre 3-15%. Diversos estudios y el metanálisis de Oxford han demostrado también, que los regímenes con antraciclinas son superiores que los regímenes con Metotrexato. Así mismo, recientemente, tres estudios aleatorizados (de los grupos CALGB, BCIRG y NSABP, respectivamente)

han mostrado un incremento de la supervivencia libre de enfermedad y (dos de ellos) de la supervivencia global con la adición a la combinación de antraciclinas de un taxano en pacientes con carcinoma de mama y ganglios positivos.

QUIMIOTERAPIA PALIATIVA

Cerca del 40% de las mujeres con cáncer de mama terminan presentando diseminación a distancia de la enfermedad. No existe tratamiento curativo para la gran mayoría de estas pacientes, por lo que el tratamiento está encaminado a lograr una paliación de los síntomas y un aumento de la supervivencia. Las armas terapéuticas disponibles para el tratamiento del cáncer de mama diseminado son: hormonoterapia, quimioterapia, trastuzumab, bifosfonatos, cirugía y radioterapia.

Con una adecuada selección de la terapia mas adecuada en cada momento se logrará la mejor calidad de vida y la mayor supervivencia.

1.4.4. HORMONOTERAPIA

HORMONOTERAPIA ADYUVANTE

La hormonoterapia adyuvante se ha mostrado capaz de reducir las recurrencias en aproximadamente el 15% de las pacientes y aumentar la supervivencia en mujeres con cáncer de mama operable. Este beneficio se limita a las mujeres con receptores hormonales positivos. En mujeres premenopáusicas tanto la ovariectomía como los análogos LHRH y tamoxifeno ejercen un efecto positivo.

En las mujeres posmenopáusicas, tamoxifeno ha sido la terapia tradicional de elección. Los inhibidores de la aromatasa han demostrado tener un papel importante en el tratamiento complementario del cáncer de mama en este grupo de pacientes. De hecho, la incorporación de estos fármacos ha representado una aportación de gran impacto en los últimos años.

Existen dos tipos de estudios que han evaluado el papel de los inhibidores de la aromatasa: a) Los estudios de administración inicial y b) los estudios de administración secuencial.

Estudios de administración inicial

El estudio ATAC (Anastrozol, Tamoxifen Alone or in Combination), incluyó un total de 9366 mujeres posmenopáusicas, tanto con afectación ganglionar como sin ella. En este estudio se comparó la administración de tamoxifeno durante 5 años, respecto a la administración de anastrozol o la combinación de ambos fármacos. Con una mediana de seguimiento de 47 meses, la probabilidad de estar libre de enfermedad fue de 86,9% para las mujeres que recibieron anastrozol, en comparación con el 84,5% del grupo que recibió tamoxifeno. El anastrozol era

capaz de reducir en un 17% el riesgo de recurrencia en comparación con el tamoxifeno. El beneficio del anastrozol fue superior en las mujeres cuyos tumores tenían expresión de receptores de estrógeno. La incidencia de un tumor en la mama contralateral fue menor en las pacientes que recibieron anastrozol. El tratamiento combinado de tamoxifeno y anastrozol no demostró ser superior a tamoxifeno.

El tratamiento con anastrozol fue bien tolerado, con una menor incidencia de efectos adversos de tipo vascular o en la esfera ginecológica en comparación con el tamoxifeno. Sin embargo, la frecuencia de aparición de trastornos músculo-esqueléticos y fracturas poróticas fueron superiores en las mujeres asignadas a recibir anastrozol.

Estudios de administración secuencial

De forma más reciente se han comunicado los resultados iniciales de tres estudios aleatorizados sobre la administración secuencial de los inhibidores de la aromatasa tras un intervalo de tratamiento con tamoxifeno.

El primero de estos estudios, es el estudio MA.17 que intentaba demostrar si la adición de letrozol tras 5 años de tamoxifeno tenía algún beneficio. En este estudio se incluyó un total de 5187 mujeres. Tras alcanzar el número de eventos necesarios y con una mediana de seguimiento de 2 años y medio, las mujeres que habían sido asignadas a recibir letrozol presentaban una menor probabilidad de recurrencia en comparación con las mujeres asignadas a recibir placebo (el intervalo libre de enfermedad a los 4 años fue de 93% para las mujeres que recibieron letrozol en comparación con el 83% para aquellas asignadas al grupo control). Las sofocaciones, artralgias y mialgias fueron más comunes en las mujeres que recibieron letrozol, pero en este grupo existió una menor incidencia

de sangrado vaginal, aunque la frecuencia de estos eventos resulto ser baja. No se observaron diferencias en la probabilidad de supervivencia, si bien se debe reconocer que el tiempo de seguimiento es corto. Estos resultados sugieren que la administración de letrozol durante 2 años y medio tras la suspensión del tamoxifeno permite reducir en un 47% el riesgo de recidiva en las mujeres postmenopáusicas con tumores de mama y receptores hormonales positivos, independientemente de la existencia de afectación ganglionar axilar. Al mismo tiempo, la adición de letrozol permitió una disminución del riesgo de aparición de un tumor en la mama contralateral. En base a estas observaciones este estudio fue finalizado de forma prematura, a pesar de que menos de un 1% de las enfermas habían recibido 4 años de medicación. A las pacientes asignadas al grupo control se les ofreció la posibilidad de recibir letrozol y este procedimiento puede limitar la interpretación del impacto de la terapia en la supervivencia de estas mujeres.

El segundo estudio, es el estudio IES.031 que planteó el papel del exemestano en la adyuvancia. Las pacientes posmenopáusicas que se encontraban en el curso de 2-3 años de tratamiento con tamoxifeno y, sin evidencia de recurrencia, fueron aleatorizadas a recibir 2-3 años de exemestano o bien seguir con tamoxifeno hasta completar los 5 años de tratamiento. En este estudio se incluyó un total de 4742 enfermas. Con una mediana de seguimiento de 30,6 meses, el exemestano obtuvo una reducción significativa del 32% del riesgo de recidiva. El beneficio absoluto fue del 4,7% a los 3 años de la aleatorización. De igual modo, se constató una reducción en la incidencia de un tumor mamario en la glándula contralateral. No se observaron diferencias en la supervivencia entre ambas modalidades de tratamiento. El beneficio del tratamiento con exemestano se observó en todas las enfermas, tanto si tenían afectación ganglionar como sin ella. Dicho efecto no se vio influido por la administración previa de quimioterapia. Los efectos adversos que fueron mas frecuentes con

exemestano fueron artralgias y diarreas. Las mujeres que recibieron tamoxifeno presentaron con mayor frecuencia síntomas ginecológicos y sangrado vaginal.

El tercer estudio corresponde a los resultados del estudio ITA que tenía un diseño similar al anterior estudio pero el fármaco escogido era el anastrozol. En el citado ensayo se incluyó un total de 526 enfermas. Con una mediana de seguimiento de 24 meses, se observó en el grupo que recibió anastrozol tras 2- 3 años de tamoxifeno, una reducción del riesgo de recurrencia del 36%. La incidencia de efectos adversos fue superior en las enfermas que recibieron tamoxifeno.

Existen algunos estudios pendientes de resultados como es el estudio BIG-FEMTA que analiza el papel del letrozol en la adyuvancia. Este estudio compara el letrozol con el tamoxifeno administrado durante 5 años y el tratamiento secuencial de tamoxifeno seguido de letrozol y la secuencia inversa con una duración máxima de tratamiento de 5 años.

El estudio TEAM realizado con exemestano tiene el objeto de pulsar el papel de este inactivador de la aromatasa en comparación con el tamoxifeno. Por último el estudio ARNO compara un esquema secuencial de tamoxifeno seguido de anastrozol en relación con la administración de tamoxifeno durante 5 años.

El conocimiento de los resultados de todos estos estudios permitirá establecer con mayor contundencia el papel de los inhibidores de la aromatasa en la terapia hormonal adyuvante del cáncer de mama. Por otra parte, el análisis de algunos marcadores moleculares ayudará a identificar con mejor precisión, aquellas pacientes que se benefician más de una estrategia terapéutica determinada. En este sentido los estudios de tratamiento primario con inhibidores de la aromatasa han sugerido que los tumores con sobreexpresión de c-erb-B2

presentaban un mayor índice de respuestas con un inhibidor de la aromatasas en comparación con aquellos que recibían tamoxifeno.

HORMONOTERAPIA PALIATIVA

A la hora de tomar una decisión terapéutica en la enfermedad metastásica de mama, las enfermas son usualmente clasificadas como de bajo o alto riesgo. Las enfermas de bajo riesgo son aquellas con enfermedad hormonosensible (RH positivos), y que no precisan una rápida respuesta al tratamiento. Estas pacientes son usualmente tratadas con hormonoterapia.

La hormonoterapia induce respuestas en más del 50% de las enfermas con receptores hormonales positivos²⁴. Un 20% adicional presenta beneficio clínico sin respuesta (estabilización de larga duración). Tras la respuesta a una primera línea, las enfermas suelen responder a una segunda e incluso a una tercera.

La terapia hormonal es distinta en las mujeres premenopáusicas o posmenopáusicas. En el primer caso la abolición de la función ovárica mediante castración o análogos LHRH es la opción a considerar. En las mujeres posmenopáusicas los inhibidores de la aromatasas de tercera generación (anastrozol, letrozol, exemestano) se han constituido como la primera línea de tratamiento hormonal de estas enfermas.

1.4.5. AGENTES BIOLÓGICOS. TRASTUZUMAB

Las pacientes con sobreexpresión de her2/neu se benefician del uso de trastuzumab. Un reciente estudio con trastuzumab en monoterapia como primera línea de tratamiento en pacientes con enfermedad metastásica ha mostrado un 30% de respuestas y un 50% de beneficio clínico con mínima toxicidad ²⁵. En combinación el principal efecto adverso reportado junto con las antraciclinas fue la cardiotoxicidad, motivo por el cual se prefiere su combinación con otros agentes como los taxanos ²⁶.

El Trastuzumab como tratamiento adyuvante se encuentra actualmente en estudio y constituye una interesante opción para las mujeres que sobreexpresan c-erbB-2.

2. QUIMIOTERAPIA DE ALTAS DOSIS CON TRANSPLANTE AUTOLOGO DE CELULAS STEM CELL DE SANGRE PERIFERICA

2.1. COMIENZOS

En los últimos 30 años, el trasplante de células progenitoras como forma de rescatar el sistema hematopoyético, pasó de ser un tratamiento experimental a ser el tratamiento de elección en algunas enfermedades neoplásicas y no neoplásicas. Los avances en el conocimiento de la biología del trasplante así como las mejoras en los tratamientos de soporte (transfusiones, nutrición, antibióticos), hizo disminuir su mortalidad y morbilidad, lo que se tradujo en un aumento del número de trasplantes de células progenitoras realizados.

Además del trasplante de células hematopoyéticas a partir de un donante HLA compatible (trasplante alogénico), el tratamiento con dosis altas de quimioterapia seguidas del trasplante autólogo de progenitores (infusión de las propias células del enfermo) ha ocupado un lugar relevante como terapéutica de enfermedades hematológicas (linfomas, leucemias, mielomas) y desde principios de la década de los 90 en neoplasias como el cáncer de mama, ovario o tumores germinales.

En el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TACH) las propias células del paciente se utilizan para rescatar el sistema hematopoyético. No requiere un tratamiento inmunosupresor de acondicionamiento y se fundamenta en el concepto de la dosis repuesta. Su finalidad no es sustituir un sistema hematopoyético enfermo o inexistente, sino posibilitar dosis de quimioterapia letales capaces de eliminar las células tumorales residuales, manteniendo la posibilidad de recuperar la hematopoyesis.

Al final de los años 80 y principios de los 90 tras varios estudios Fase II en pacientes afectas de cáncer de mama de alto riesgo ^{27,28} o carcinoma metastásico ^{29, 30, 31} el trasplante autólogo con progenitores hematopoyéticos de sangre periférica se reveló como un tratamiento prometedor con índices de respuesta y supervivencia (tanto global como libre de enfermedad y progresión) no alcanzadas con las terapias convencionales hasta ese momento.

Ante dichos hallazgos muchos fueron los hospitales que se lanzaron a realizar dicho tratamiento y muchas las pacientes con carcinoma de mama que recibieron Quimioterapia de Altas Dosis (QAD). Solamente en Europa y entre el 1 de enero de 1990 y el 31 de diciembre de 1999 fueron registradas 7471 por el European Group for Blood and Marrow Transplantation Registry ³².

2.2. EVOLUCION

Tras los estudios fase II ya comentados y varios años de seguimiento se fueron conociendo los resultados de varios estudios Fase III ³³⁻⁴² donde se comparaban la Quimioterapia de altas dosis con tratamientos más convencionales en carcinoma de mama de alto riesgo que vamos a pasar a comentar.

Giani y Bonadonna ³⁹ compararon la QAD con tratamientos convencionales incluyendo 382 pacientes con carcinoma de mama y 4 o más ganglios afectados resultando en un primer análisis una diferencia marginal respecto a la supervivencia libre de enfermedad (SLE) a los 5 años (65 % vs 62%) a favor de la QAD con una mediana de seguimiento de 52 meses. En un segundo análisis y tras una mediana de seguimiento de 7 años se objetivó un aumento en la diferencia de SLE entre el grupo de QAD (60%) y el brazo control (49%) pero sin llegar a la significación estadística ($p= 0,2$). En el Anglo-Celtic study ³⁸ se randomizaron 605 pacientes con carcinoma de mama y 4 o más ganglios positivos asignándose a recibir cuatro ciclos de Adriamicina seguidos de CMF o QAD con movilización con Ciclofosfamida. Después de una mediana de seguimiento de 5 años no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) entre la rama de QAD y la de control (SLE 57% vs 54%; $p= 0,7$), ni en la supervivencia global (62% vs 64% $p= 0,4$).

Sin embargo también existen estudios randomizados con resultados positivos a favor de la quimioterapia de altas dosis como el estudio francés Pegase-01 ⁴⁰ que incluyó 314 pacientes con mas de 7 ganglios afectados en el que se objetiva una SLE a los 3 años a favor de la QAD comparada con la quimioterapia convencional de 71% vs 55% con $p= 0,02$, pero sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia global. Rodenhuis y colaboradores ³⁴ realizó un estudio comparativo con FEC seguido o no de QAD en pacientes con 4 ó mas ganglios afectados, inicialmente tras una mediana de

seguimiento de 4 años y medio y en 284 pacientes encontró diferencias a favor de la QAD en términos de SLE (77% vs 62%; $p = 0,9$) pero sin una diferencia estadísticamente significativa. Posteriormente y tras 57 meses de seguimiento y con datos de 885 pacientes encuentran un aumento de la supervivencia libre de progresión con superior supervivencia libre de enfermedad de manera significativa en el brazo de QAD en el subgrupo de pacientes con 10 ó más ganglios afectados ⁴¹, otros subgrupos analizados que se asocian con un efecto positivo en términos de SLE fueron las pacientes jóvenes ($p = 0,05$), aquellas con expresión Her2 negativa ($p = 0,02$) y en los tumores mamarios de bajo grado ($p = 0,002$).

Se han publicado otros estudios con resultados diversos y metodología discutible, como en el Scandinavian Breast Cancer Study ³⁷ que se randomizaron 525 pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo a recibir QAD (tras la QT de inducción) o dosis escaladas de Fluoracilo- Epirrubucina - Ciclofosfamida pero los resultados no pueden ser utilizados como argumento puesto que no hubo dosis convencionales en el brazo control sino dos diferentes esquemas de intensificación.

2.3. SITUACION ACTUAL

Durante el año 2004 han seguido publicándose nuevos estudios Fase III sobre QAD así como nuevos análisis de los ya realizados con mas período de seguimiento. En abril de 2004 Zander publica en el Journal of Clinical Oncology ⁴³ su experiencia con 307 mujeres diagnosticadas de carcinoma de mama y con 10 o más ganglios axilares afectados. Randomizadas a recibir QAD vs CMF, previamente habían sido tratadas todas las pacientes con 4 ciclos de quimioterapia con antraciclinas. Tras 3,8 años de seguimiento no se objetivan diferencias significativas en SLE ni en SG entre los dos grupos.

En el congreso de ASCO (American Society of Clinical Oncology) 2004 aparecen dos estudios con pocos pacientes y con diferentes resultados que mostramos en la Tabla II.

Tabla II:

ABST.	ESTUDIO	ESQUEMA	PACIENTES	SEGUIM.	RR	TTP	SG
631	Fase III IBDIS-1 (1ª línea)	Tandem HD	56	55m	71%	439d	949d
		Vs AC -> CMF	54		44%	p = 0.003 322d	(ns) 804d
641	Fase III (1ª línea)	Tandem HD	48	22,5m	66,7%		26,9 m
		Vs Adr+Ptx	45		64%		23,4 m

En conclusión podemos decir que la evidencia nos revela que sigue existiendo una inquietud investigadora sobre la QAD en pacientes con cáncer de

mama de alto riesgo con resultados divergentes entre los estudios que conocemos hasta ahora, por lo que sería lícito pensar que un metanálisis es necesario para intentar aclarar el posible beneficio de este tratamiento y evaluar si pudiera existir un subgrupo de pacientes (mas de 10 ganglios afectados, jóvenes...) en las que ese beneficio fuera realmente significativo.

3. INMUNOLOGIA

No es el objetivo de este trabajo el realizar una revisión exhaustiva sobre la biología del sistema inmune, por lo que solo se exponen sus aspectos más generales.

3.1 ASPECTOS GENERALES DE LA INTERACCION ENTRE EL SISTEMA INMUNE Y EL CANCER

El cáncer aparece en los seres humanos pese a la existencia del sistema inmune, y en la mayor parte de los pacientes tan solo pueden detectarse ciertas evidencias de respuesta inmunológica frente al cáncer, si es que se detecta alguna.

3.1.1 PRESENTACION DEL ANTIGENO AL SISTEMA INMUNE

La estructura de un antígeno capaz de estimular una respuesta inmune de tipo celular consiste en un péptido corto presentado por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Existen dos tipos de moléculas del CMH, conocidas como clase I y clase II.

Las moléculas de clase I se expresan en la superficie de la gran mayoría de las células del organismo. En los seres humanos se corresponden con las moléculas HLA-A, B y C. Presentan péptidos cortos, de entre 8 a 10 aminoácidos, provenientes de cualquier proteína intracelular. Estas proteínas se degradan constantemente en los proteosomas de las células, y los péptidos resultantes se unen en el retículo endoplásmico a las moléculas CMH de clase I. El péptido se une fuertemente a la molécula del CMH mediante dos puntos de unión, siendo entonces presentado a la superficie celular.

Las moléculas del CMH de clase II se corresponden en los seres humanos a las moléculas HLA-D. Su expresión tisular está limitada a las células presentadoras de antígenos (CPA), que comprenden linfocitos B, macrófagos y células dendríticas. Presentan péptidos de cadena más larga, procedentes de proteínas del exterior de la célula captadas mediante vesículas endocíticas. Ello es así porque su papel principal es el de iniciar una respuesta inmune, principalmente debido a una agresión exterior al huésped. Ello queda claro con las infecciones bacterianas o parasitarias, pero también puede iniciarse una respuesta inmune, frente a las proteínas captadas por CPA que hayan sido liberadas por células lesionadas que hayan muerto por apoptosis.

3.1.2 EXPRESION DE ANTIGENOS TUMORALES

Las células tumorales presentan una amplia gama de mutaciones genéticas y de alteraciones de expresión génica. Dado que estos genes dan lugar a la producción de proteínas anormales o bien de proteínas normales en exceso, el proteosoma las presentará al azar en la superficie de las células tumorales como moléculas de clase I del CMH. Además, cuando estas células mueran, sus proteínas pueden ser captadas por CPA y presentadas como moléculas de clase II del CMH, iniciando una respuesta inmune.

Se pueden distinguir dos tipos según su grado de restricción a la célula neoplásica: *a)* antígenos específicos de tumor o TSA (*tumor specific antigen*), y *b)* antígenos asociados a tumores o TTA (*tumor associated antigen*).

A. Antígenos específicos de tumor.

Se originan directamente por la alteración de proteínas que intervienen en el proceso de transformación. Son proteínas codificadas por oncogenes o genes

supresores con un papel fundamental en la regulación de la proliferación y diferenciación de células normales. El más conocido es el gen supresor p53 cuya alteración está implicada en la patogénesis de distintos tumores.

B. Antígenos asociados a tumor.

La mayoría de los antígenos tumorales pertenecen a este grupo. Son proteínas, lípidos o carbohidratos que se expresan fundamentalmente en las células neoplásicas, aunque también lo hacen en tejidos normales. No tienen una relación directa con el proceso de malignización y aparecen como alteraciones secundarias a este.

3.1.3 LA HIPOTESIS DEL PELIGRO

La descripción de los autoantígenos con los que el sistema inmune puede reaccionar ha cambiado los paradigmas existentes en el mundo de la inmunología. La distinción entre lo propio y lo no propio se ha hecho menos importante; en lugar de ello, el sistema inmune parece capaz de diferenciar la expresión del mismo antígeno en distintos medios, decidiendo si es adecuado reaccionar con el mismo. El centro de atención ha cambiado desde cuál es el origen del antígeno (propio o no propio) a como éste es presentado al sistema inmune (en forma estimuladora o inhibidora). Este concepto fue postulado por *Polly Matzinger* como la “hipótesis del peligro”. Cuando un antígeno es presentado en un ambiente de peligro estimula una respuesta inmune, y cuando el mismo antígeno es presentado en un ambiente carente de peligro induce la aparición de tolerancia. Durante los últimos años, la “hipótesis del peligro” ha sido estudiada en varios sistemas, y parece ajustarse estrechamente a cómo se conduce el sistema inmune.

Los complejos CMH/péptido no inician respuestas inmunes por sí mismos. Una respuesta inmune sigue un patrón con dos señales, una correspondiente al

complejo CMH/péptido (señal 1) y otra que corresponde a una serie de moléculas coestimuladoras (señal 2). Puesto que la presentación del antígeno constituye el elemento decisivo para que haya respuesta o tolerancia, resulta clave el papel de la CPA que posea la mayor concentración de CMH/péptido y de moléculas coestimuladoras. Cuando un antígeno es presentado por células no CPA (células tumorales en nuestro caso), el antígeno es presentado sin coestimulación (primera señal sin segunda señal), por lo que no es percibido como peligroso por el sistema inmune. Si el mismo antígeno es presentado por las CPA, aparece tanto la primera señal como la segunda, y el sistema inmune percibe el peligro frente a ese antígeno. La magnitud de la primera y de la segunda señal en la superficie de las CPA aumenta cuando dichas células son expuestas a productos bacterianos infectados con virus o bien son reconocidas por los linfocitos T CD4+ activados, siendo obviamente situaciones “de peligro” todas ellas.

3.1.4 CELULAS PERTENECIENTES AL SISTEMA INMUNE

Células presentadoras de antígenos

Las células especializadas en la presentación del antígeno son los linfocitos B, los macrófagos y las células dendríticas. Los linfocitos B tienden a encaminar al sistema inmune hacia una respuesta de tipo humoral, la cual resulta muy eficaz para eliminar los patógenos particulados (bacterias y otros microorganismos extracelulares) pero tiene una capacidad limitada para hacer frente a los patógenos intracelulares (virus) o a las células que presenten un comportamiento anormal (células tumorales). Los monocitos y los macrófagos poseen el mecanismo adecuado, al tener la capacidad de captar material apoptótico del compartimento extracelular, de procesar y presentar epítomos antigénicos en complejos CMH junto con moléculas coestimuladoras, y de producir citoquinas estimuladoras. Sin embargo, estas células han evolucionado para hacerse cargo

de la eliminación de los restos celulares, y su expresión antigénica no tiene como fin el de ser percibida como “peligrosa”. De hecho, se ha demostrado que la presentación de antígenos extraños por los macrófagos induce tolerancia. El papel de iniciar una respuesta inmune celular ha sido cedido a las células dendríticas, un tipo de células estrechamente relacionadas. Las células dendríticas tienen niveles más elevados del CMH, de coestimulación y de expresión de las moléculas de adhesión que los macrófagos y los linfocitos B, y se encuentran en pequeños números en cualquier tejido periférico, donde se especializan en captar antígenos (las células de Langerhans son células dendríticas que se encuentran en la piel, lo cual constituye un buen ejemplo del papel de centinela que ejercen las células dendríticas en tejidos periféricos). La captación de antígenos produce una serie de cambios en el fenotipo de la células dendrítica, dando lugar a que ésta ejerza su siguiente función, la de presentar el antígeno al sistema inmune, con lo que gana la capacidad de migrar a través de los vasos linfáticos a las zonas pobladas con linfocitos T en los órganos linfoides (ganglios linfáticos, bazo) y pierde la capacidad de captar antígenos. La cuantía del CMH (cuya densidad en células dendríticas es 10 a 100 veces mayor que la de macrófagos activados o la de linfocitos B), de coestimulación y de expresión de superficie de las moléculas de adhesión aumenta, haciendo de ella la célula ideal para la identificación de los linfocitos T. La activación selectiva de los linfocitos T que no hayan estado en contacto con el antígeno se ve potenciada por la secreción de quimiocinas específicas de los linfocitos T que no hayan estado en contacto con el antígeno. Este proceso es denominado maduración de la célula dendrítica.

En los últimos años se han descrito algunos métodos para producir grandes cantidades de células dendríticas *ex vivo*. Así mismo, se han descrito las moléculas inmunosupresoras derivadas del tumor que inhiben la maduración de las células dendríticas y su función *in vivo*. Se ha demostrado que las células dendríticas de los animales portadores de tumores y de los pacientes con cáncer tienen una función presentadora del antígeno subóptima debido al factor de

crecimiento endotelial vascular producido por el tumor, a la IL-10 y a las prostaglandinas. Cuando las células dendríticas de estos huéspedes portadores de tumores se diferencian *in vivo* gracias a medios que contengan GM-CSF, sus células dendríticas pueden ser rescatadas y convertirse en presentadores eficientes del antígeno al igual que las células dendríticas originadas a partir de individuos libres de cáncer, evitando por tanto los efectos inmunosupresores de los tumores. Ello proporciona una razón de peso para utilizar células dendríticas generadas *in vitro* en la inmunoterapia del cáncer.

Linfocitos T CD4+

El papel primordial de estas células es el de activar los linfocitos T CD8+ específicos para un determinado antígeno, comúnmente conocidos como linfocitos T “cooperadores”. Esta definición no valora suficientemente el papel real de los linfocitos T CD4+, dado que en muchas situaciones resultan indispensables para iniciar las respuestas citotóxicas mediadas por los linfocitos T CD8+. Los linfocitos T CD4+ identifican los péptidos de cadena larga presentados por las moléculas de clase II del CMH. Dado que la expresión de clase II del CMH está limitada principalmente a las CPA “profesionales”, impide que el sistema inmune se active abiertamente frente a los autoantígenos. Cuando un linfocito T CD4+ identifica a su antígeno específico en la superficie de una CPA, se liga a la clase II del CMH/péptido con su receptor de linfocitos T (TCR), creando un complejo conocido como “sinapsis inmunológica” formado por varias moléculas del CMH, moléculas de adhesión y moléculas coestimuladoras. Si la afinidad de unión, las características de los péptidos y el número de moléculas de CMH/péptido son óptimos, se activarán los linfocitos T CD4+, los cuales, a su vez, activan a las CPA mediante el acoplamiento entre el ligando CD40 (sobre la célula T CD4+) y el receptor CD40 (sobre la CPA). La activación de la CPA incrementa la capacidad de activar los linfocitos T CD8+. Posteriormente la función de los linfocitos T

“cooperadores” es determinada por la producción de ciertas citoquinas activadoras (tipo 1) o inhibitoras (tipo 2). La CPA también produce los mismos tipos de citoquinas, las cuales crean un medio facilitador o inhibidor de la activación de los linfocitos T CD8+ y que finalmente dará lugar a la lisis de las células objetivo. Las citoquinas de tipo 1 se asocian a la producción de una respuesta citotóxica y comprenden el INF- γ , la IL-2 y el TNF- α cuando su producción es debida a los linfocitos T “cooperadores”, y las mismas citoquinas más la IL-12 al ser producidas por la CPA. Las citoquinas de tipo 2 tienen el efecto opuesto, esto es, el de regular la depresión de la respuesta citotóxica.

Linfocitos T CD8+

Los linfocitos T CD8+ son las células efectoras primarias del sistema inmune, habitualmente conocidas como linfocitos T citotóxicos. Su papel principal es el de identificar los complejos de clase I del CMH/péptido en la superficie de cualquier célula produciendo su muerte por citotoxicidad. Los péptidos identificados por los linfocitos T CD8+ son de cadena más corta que los identificados por los linfocitos T CD4+. La activación de los linfocitos T CD8+ que no hayan estado en contacto con el antígeno y su proliferación requiere la identificación de su antígeno específico (señal 1) en la superficie de una CPA activada, junto con la coestimulación de la molécula B7 (señal 2) la presencia de las moléculas de adhesión y la de un medio estimulador que contenga citoquinas de tipo 1. Si este linfocito T CD8+ que no ha estado en contacto con el antígeno tan solo identifica un complejo CMH/péptido en ausencia de una segunda señal adecuada (coestimulación), el linfocito T CD8+ quedará en estado de anergia, tal y como sucede cuando los antígenos tumorales son expresados por las células del tumor o por células normales en reposo. Esta situación cambia después de la activación de los linfocitos T CD8+. Cuando un linfocito T CD8+ activado encuentra su complejo específico de CMH/péptido en la superficie de una célula diana, pone en marcha el mecanismo para suprimirla sin requerir la presencia de

la señal 2 (por consiguiente, ello puede suceder cuando el antígeno es presentado por las células tumorales). La actividad de citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ es mediada por la liberación de perforina, la cual forma un poro en la membrana de la célula objetivo y libera granzima B, que se introduce en la célula objetivo a través del poro de perforina y pone en marcha la activación de la cascada de caspazas (una serie de proteasas de serina intracelulares), conduciendo a la muerte por apoptosis. Dado que éste es un sistema potente de ataque, existen rigurosos mecanismos reguladores. Si no existen citoquinas estimuladoras, los linfocitos T CD8⁺ activados mueren por privación, y si se reconocen repetidamente demasiados antígenos, los linfocitos CD8⁺ activados regulan la estimulación del receptor Fas (una molécula de la superfamilia del TNF) y del ligando Fas, dando lugar a la muerte de una célula a manos de otra (linfocitos T CD8⁺ activados en forma semejante) o al suicidio por apoptosis, mediados por el mismo sistema de la cascada de caspase. Los linfocitos CD8⁺ también pueden producir citoquinas polarizadas de tipo 1 o de tipo 2, y se han descrito linfocitos T CD8⁺ productores de citoquinas no citotóxicas.

Células “natural killer” (NK)

Estas células pertenecen al sistema inmune innato. Su actividad asesina es inhibida por la identificación de las moléculas del CMH en la superficie de la célula. Ello protege a las células normales del huésped del ataque de las células NK. Sin embargo, cuando las células presentan una expresión disminuida del CMH o bien una ausencia de ésta, o si las células tienen una molécula extraña del CMH, son eliminadas por células NK. Las células NK también pueden ser activadas por células dendríticas, produciendo citoquinas de tipo 1 y 2, y enlazando de este modo el sistema inmune no específico del antígeno (innato) y el específico del antígeno (adaptativo). Las relaciones concretas entre las respuestas de las células NK y los linfocitos T específicos del antígeno todavía no se han comprendido por

completo, y se ven complicadas por la capacidad de las células NK de lisar las CPA debido a la anulación del efecto protector de la expresión del propio CMH mediante la aparición concomitante de niveles elevados de expresión de la molécula B7 coestimuladora.

Linfocitos T “natural killer” (NKT)

Recientemente se han descrito las células que expresan un TCR y un receptor NK.1⁴⁴. Al igual que las células NK, también parecen enlazar el sistema inmune innato y el adaptativo. Pueden ser activados por las células dendríticas y tienen la capacidad de producir citoquinas tipo 1 y tipo 2 en forma altamente polarizada en un tiempo relativamente corto en relación a otros tipos celulares. Parecen actuar en una forma más simple, como un sistema inmune primitivo, dado que reconocen una serie limitada de antígenos presentados por las moléculas CD1 no polimórficas CMH “like”. La molécula CD1 tiene una gran expresión en la superficie de las células dendríticas y se une a un grupo poco frecuente de epítomos, los cuales son principalmente de origen lipídico. La gama de antígenos presentados por la molécula CD1 no es tan amplia como con la clase I y II del CMH. Además, en muchos casos, los genes utilizados por los linfocitos T NK se limitan a un cierto gen V. Su relación concreta con las respuestas específicas del antígeno no está clara, pero puede ser de importancia como paso inicial de una respuesta inmune y de la polarización de tipo 1/tipo 2.

Linfocitos B

No está claro el papel que desempeñan los linfocitos B en la respuesta inmune antitumoral. Se sabe que las inmunoglobulinas son mediadores en otros procesos celulares que eliminan las células neoplásicas. Así, pueden unirse a las células malignas y mediar la opsonización y fagocitosis por parte de los

macrófagos. También pueden intervenir en la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos.

3.1.5 ESCAPE DE LA INMUNOVIGILANCIA

El desarrollo de las neoplasias en presencia de un sistema inmunitario se explica por dos grandes mecanismos patogénicos no mutuamente excluyentes. Por un lado, una inmunodeficiencia que puede ser primaria o inducida por el propio tumor y, por otro lado, la selección de clones de células neoplásicas con nula o escasa inmunogenicidad.

Déficit en el reconocimiento de células neoplásicas

La pérdida o alteración de los antígenos del CMH de clase I por la célula tumoral puede evitar la lisis por los linfocitos T citotóxicos. Otro mecanismo puede ser la pérdida de las moléculas de adhesión no antígeno específicas sobre los tumores. El enmascaramiento o disminución de los antígenos tumorales impide el reconocimiento linfocitario.

Supresión de la respuesta inmunitaria

Existiendo un sistema inmunitario competente puede producirse el crecimiento tumoral por la inducción de una deficiencia funcional. En la patogenia de estas inmunodeficiencias participan diversos mecanismos, como la inducción de células T supresoras específicas, la generación de anticuerpos antiidiotípicos con actividad bloqueante, el desarrollo de una tolerancia inmunológica a una elevada “carga” antigénica extraña y otros procesos no bien definidos. Tanto “in vivo” como “in vitro” se ha demostrado que la anergia de células T antígeno-específicas es un fenómeno precoz en la progresión tumoral ⁴⁵. Junto a este

mecanismo específico participan otros inespecíficos, como la secreción de citoquinas con actividad inhibidora sobre las células efectoras y reguladoras del sistema inmunitario.

También se conoce desde hace unos años la pérdida de la cadena z del TCR (receptor antigénico del linfocito T) en los linfocitos T de pacientes con cáncer avanzado. En estudios posteriores se ha encontrado que, mientras en pacientes con cánceres diseminados en fases finales todos los linfocitos del organismo presentan este defecto, en pacientes con enfermedad localizada sólo se halla en los linfocitos antitumorales y no en sangre periférica.

Factores estructurales del crecimiento tumoral

Una célula tumoral puede evitar la detección por el sistema inmunitario, de manera que si un antígeno no es detectado con la suficiente rapidez, cuando el tumor es reconocido ha crecido más allá de un tamaño combatible.

Un tumor puede estimular una respuesta inmunitaria de forma inmediata, pero su rápido índice de crecimiento o su relativa inaccesibilidad (“santuarios inmunológicos”) puede provocar un desequilibrio entre crecimiento y destrucción traduciéndose en la progresión tumoral.

3.2 RECONSTITUCION INMUNE TRAS QUIMIOTERAPIA DE ALTAS DOSIS

Tras la QAD y la reinfusión de las células progenitoras periféricas, la reconstitución de la hematopoyesis constituye el factor esencial del tratamiento y aunque la recuperación de Neutrófilos y Plaquetas es a menudo considerado como el "endpoint" de la recuperación hematológica, no se debe ignorar que la recuperación inmunológica ocurre de manera gradual pudiendo tardar un año o más hasta llegar a la normalidad.

Varios han sido los autores que se han interesado por la recuperación inmunológica tras la quimioterapia de altas dosis y autotransplante de células progenitoras de sangre periférica, la mayoría de ellos incluyen pacientes diagnosticados de enfermedades hematológicas (Linfomas no-Hodgkin, leucemias mieloides agudas, mieloma múltiple). Destacaremos una publicación de la revista Blood ⁴⁶ en la que se realiza una revisión de la recuperación inmune en pacientes sometidos a QAD y autotransplante con rescate de células stem cell de sangre periférica que comentaremos mas adelante.

En relación al cáncer de mama pocos son los estudios encontrados, pudiendo nombrar un estudio americano ⁴⁷ que examina la recuperación de la inmunidad celular y humoral en 28 pacientes con carcinoma de mama avanzado sometidas a QAD.

Tanto en el estudio publicado en la revista Blood, como en el estudio americano, se da importancia no solo a la recuperación de la respuesta inmune y sus componentes celulares desde el punto de vista cuantitativo, sino también realizan un seguimiento de la recuperación de la función inmune, que pasamos a comentar.

Recuperación de las células T tras la QAD

Después del trasplante el número relativo de células CD3+ disminuye significativamente volviendo a sus niveles normales dentro de los 3 primeros meses postransplante ⁴⁸. Una disminución en el número absoluto y relativo de células CD4+ en sangre periférica es vista normalmente pudiendo persistir dicha alteración durante 1 año o más ⁴⁹. En contraste, el número absoluto y relativo de células CD8+ se recupera rápidamente resultando en una inversión del cociente CD4/CD8 en los meses que siguen al trasplante ^{48,49}.

La observación de una relación inversa entre el tamaño del Timo y el nivel de células CD4+ en sangre periférica tras la QAD explica la idea de que los Linfocitos T Helper se desarrollan dependiendo de la cantidad de tejido tímico funcional ⁵⁰ que como sabemos involuciona con la edad. Esta relación con el epitelio tímico tiene un papel mas importante en el desarrollo de los linfocitos T helper que en el de los linfocitos T supresores, lo que explicaría la inversión del cociente CD4/CD8 visto tras la QAD ⁵¹.

Respecto a la función de los linfocitos CD4+ y CD8+ puede ser distinguida en base al estudio de la expresión de CD45 (CD45RA, CD45RO). CD45RO+ correspondería con la “memoria celular” mientras que CD45RA+ correspondería a las células recientemente diferenciadas. En el período postransplante el subgrupo de CD4+CD45RA+ está profundamente disminuido pudiendo tardar 2 años en recuperarse. En cambio el subgrupo CD8+CD45RA+ se normaliza durante los primeros meses tras la QAD ^{48,52}.

Recuperación de las células NK tras la QAD.

Las células NK son definidas como linfocitos grandes granulares capaces de mediar reacciones citolíticas contra células tumorales y virales. Característicamente tienen fenotipo CD3⁻ CD16⁺, CD56⁺.

Las células NK son las primeras en recuperarse tras el trasplante, alcanzando niveles dentro de la normalidad en el primer mes postrasplante ^{53,54}. Estas células pueden madurar en ausencia de la función tímica ⁵⁵, explicándose así su rápida recuperación en el periodo precoz del trasplante cuando todavía la inmunidad específica se está recuperando, pudiendo aportar una importante defensa contra agentes infecciosos o células tumorales residuales.

Recuperación de las células B tras la QAD.

El número absoluto y relativo de células que expresan CD19 y CD20, dos marcadores de las células B maduras, están disminuidos los primeros 3 meses postrasplante recuperándose y llegando a niveles normales entre los 6 y 9 meses tras la QAD.

Durante el primer año la mayoría de las células B circulantes expresan el fenotipo indiferenciado CD23⁺, CD38⁺, sugiriendo que la mayoría de las células B circulantes tras el trasplante son pobremente diferenciadas ⁵⁶.

Recuperación de los niveles de Inmunoglobulinas tras la QAD.

Los niveles de Inmunoglobulinas permanecen bajos durante los primeros 3 meses tras el trasplante aproximadamente durante el mismo período en los que el número de células B circulantes está reducido ⁵⁷ aunque no todas las

inmunoglobulinas se recuperan al mismo tiempo, mientras los niveles de Ig M se normalizan a los 3 meses, la producción de IgG está disminuida de 12 a 24 meses para la mayoría de los pacientes ⁵⁶.

Recuperación de las células dendríticas tras la QAD.

Las células dendríticas (DC) son potentes células presentadoras de antígeno que son esenciales para el inicio de la respuesta inmune celular primaria. Su potencia deriva de la rica expresión de MHC clase I, clase II, coestimuladores y moléculas de adhesión necesarios para la activación de la respuesta celular T antígeno-específica. Las DC manipuladas en presencia de antígenos tumorales han sido utilizadas para generar vacunas tumorales y han sido asociadas con regresión de la enfermedad en modelos animales y estudios clínicos ⁵⁸⁻⁶¹.

Avigan en su artículo ⁴⁷ genera DC con células progenitoras de sangre periférica en varios momentos tras el trasplante (meses +1, 3, 6, 9 y 12) y previamente al tratamiento. Las DC muestran un fenotipo característico con expresión CD40, CD80, CD86 y CD54 así como una modesta expresión de CD83 como marcador específico de DC. En contraste a las diferencias objetivadas en la función de los linfocitos T, las DC mantenían su habilidad de actuar como células presentadoras de antígeno. La capacidad de las DC generadas desde precursores de sangre periférica para estimular la proliferación de las células T fue de hecho aumentada en el período postransplante.

Así según los anteriores resultados de los diferentes estudios comentados (como ya he dicho la mayoría de ellos realizados en pacientes con enfermedades hematológicas) se objetiva que los pacientes sometidas a QAD experimentan un prolongado periodo de disfunción de las células T en contraste con las células B, NK y células dendríticas que se recuperarían más rápidamente.

4. CELULAS PROGENITORAS HEMATOPOYETICAS

Células madre, potencialidad y versatilidad

Una célula madre o troncal es aquella que es capaz de dividirse indefinidamente y diferenciarse a distintos tipos de células especializadas, no sólo morfológicamente sino también de forma funcional (Fig. 1).

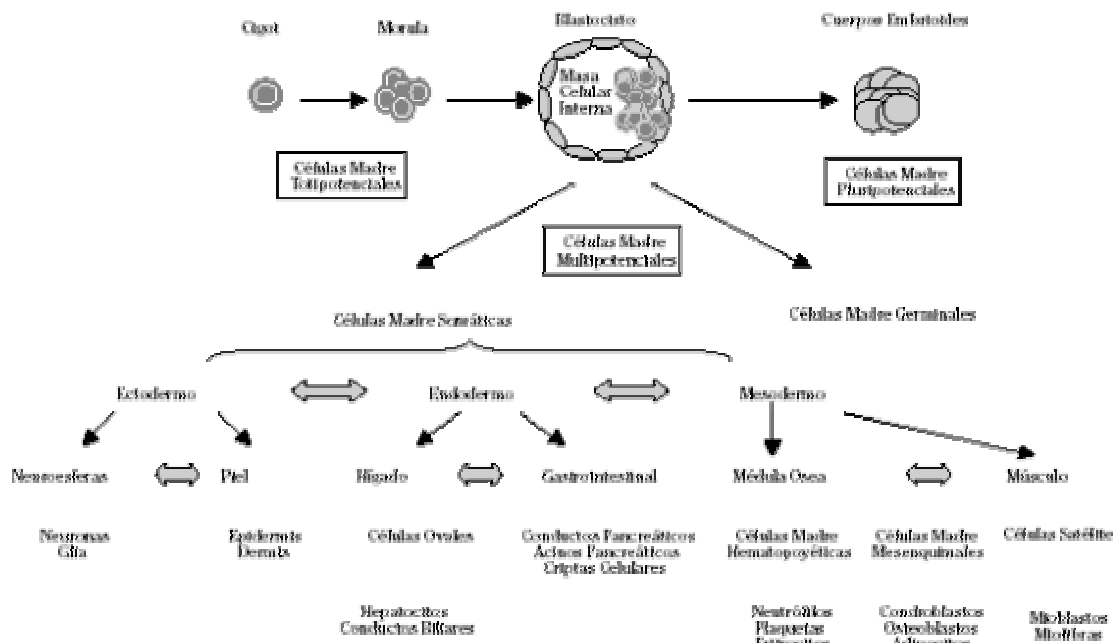


Figura 1. Modelo jerárquico de las células madre de acuerdo con su potencial.

Las células madre se pueden clasificar según su potencial de diferenciación: las células madre totipotenciales son capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario; las células madre pluripotenciales tienen la habilidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias y, por último, las células madre multipotenciales, son capaces de

diferenciarse a distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria.

Tradicionalmente se han considerado a las células madre embrionarias como células pluripotenciales, a diferencia de las células madre adultas que se han caracterizado sólo como multipotenciales. Es importante destacar que para que una célula madre pueda considerarse pluripotencial tiene que cumplir las siguientes condiciones: en primer lugar, una única célula debe ser capaz de diferenciarse a células especializadas procedentes de cualquier capa embrionaria; en segundo lugar, demostrar la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de las células a las que se han diferenciado y, finalmente, que se produzca un asentamiento claro y persistente de estas células en el tejido diana, tanto en presencia o ausencia de daño en los tejidos en los cuales se injerta.

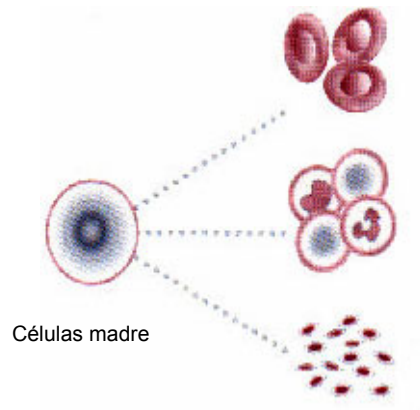
La existencia de células madre adultas en distintos tejidos, incluyendo hematopoyético, neuronal, epidérmico, gastrointestinal, músculo esquelético, músculo cardíaco, hígado, páncreas o pulmón no admite controversia. Sin embargo, cada vez parece más evidente que las células madre adultas derivadas de estos órganos, no sólo pueden generar células maduras de dicho tejido sino también tejidos derivados de otras capas embrionarias, siendo el caso más típico el de las células madre hematopoyéticas capaces de diferenciarse a tejidos como hepatocitos, músculo cardíaco, endotelio o a tejidos derivados de las tres capas embrionarias.

Células madre hematopoyéticas

Las células progenitoras hematopoyéticas (Figura 2) son capaces de reconstruir de manera integral la hematopoyesis, se caracterizan además por su capacidad de autoduplicarse, por la expresión de los antígenos CD34, CD45RaO y tHY-1. La tinción con rodamina 123 es débilmente positiva, y no hay expresión de

antígenos mieloides y linfoides T y B ni de antígenos HLA-DR. Representan aproximadamente del 1 al 2 % del total de células de la médula ósea y en condiciones normales la décima parte de este total circula en sangre periférica.

Figura 2.



El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas de sangre periférica es una variante del trasplante de progenitoras hematopoyéticas de médula ósea que se ha desarrollado gracias a la disponibilidad de los factores de crecimiento hematopoyéticos; mediante su uso se ha logrado incrementar la concentración de estas células en sangre periférica hasta 25 veces y en esta fase, las células progenitoras son coleccionadas por una o múltiples leucoféresis de flujo continuo.

Este proceder se ha desarrollado principalmente en el campo de la oncohematología para el tratamiento de hipernefromas, inmunodeficiencias congénitas, mieloma múltiple, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, linfoma no hodgkiniano, enfermedad de Hodgkin y artritis reumatoides.

Para la obtención de las células progenitoras no es necesario trasladar al paciente a la unidad quirúrgica ni aplicar anestésico alguno; la recuperación hematológica se obtiene en un tiempo menor que el observado en el transplante de médula ósea, y por lo tanto, disminuye el empleo de componentes de la sangre, acortando la estancia hospitalaria.

II- JUSTIFICACION

II- JUSTIFICACION

Como ya hemos ido comentando han sido muchas las pacientes sometidas a QAD con autotransplante de células progenitoras de sangre periférica, pero pocos los estudios que se han centrado sobre sus consecuencias a nivel inmunológico tanto desde el punto de vista observacional como de las posibles implicaciones pronosticas.

Algunos autores se han interesado por la recuperación inmunológica tras la quimioterapia de altas dosis pero la mayoría de ellos en pacientes con enfermedades hematológicas (Linfomas no-Hodgkin, leucemias mieloides agudas, mieloma múltiple) ⁶²⁻⁶⁵.

En relación al cáncer de mama pocos son los estudios encontrados, pudiendo nombrar un estudio americano ⁴⁷ que examina la recuperación de la inmunidad celular y humoral en 28 pacientes con carcinoma de mama avanzado sometidas a QAD. Los resultados muestran que los pacientes experimentan un prolongado periodo de disfunción de las células T que persiste al menos 1 año postransplante (experimentando la mayoría de las pacientes una inversión en el cociente CD4/CD8). En contraste la producción de Inmunoglobulinas y la actividad de las células NK son recuperadas más rápidamente. Las células dendríticas exhiben un fenotipo normal incluso en el período inmediato postransplante.

Estos hallazgos nos llevan a preguntarnos si por un lado pudiera existir algún factor medible del que dependiera la recuperación inmunológica en pacientes sometidas a quimioterapia de altas dosis, y si dicha recuperación podría tener implicaciones pronosticas respecto a la actividad tumoral en aquellas pacientes con cáncer de mama tanto sin enfermedad medible (adyuvancia) como en aquellas que con seguridad presentan enfermedad residual (metastásicas).

Respecto a la primera cuestión de si se pudiera encontrar algún factor implicado en la velocidad y efectividad de la recuperación de la respuesta inmunológica en pacientes con cáncer de mama parece que existe relación entre la cantidad de células progenitoras reinfundidas (CD34+) y dicha recuperación, que en algunos estudios se confirma con una relación directamente proporcional con la proliferación de Linfocitos T y NK ⁶⁶.

En base a estos hallazgos se han realizado varios estudios donde mejorando o purificando el producto reinfundido encuentran una recuperación hematológica más rápida ^{67,68}, aunque en otros casos, como en un estudio Fase III publicado en pacientes afectos de mieloma múltiple en el que realizaban una selección y enriquecimiento de las CD34+, no se han confirmado tales resultados ⁶⁹.

En cuanto a la segunda pregunta de si esta alteración inmunológica podría tener implicaciones pronósticas respecto a la posibilidad de recidiva e incluso de supervivencia de las pacientes sometidas a quimioterapia de altas dosis, podemos nombrar varios estudios como los de Luis F. Porrata y colaboradores de la Clínica Mayo donde estudian la relación entre el número de linfocitos totales en el día 15 postransplante y su relación con la supervivencia en pacientes con cáncer de mama metastásico ⁷⁰ mieloma múltiple, linfoma no-Hodgkin ⁶⁴ y leucemia mieloide aguda ⁶⁵ obteniendo cifras tan significativas como que entre las pacientes con cáncer de mama cuyo recuento de linfocitos totales era menor a 500 en el día +15 postransplante, su supervivencia global al año era del 50% en comparación con aquellas pacientes cuyo recuento era mayor a 500 cuya supervivencia fue del 91%. También hubo diferencias significativas respecto a la supervivencia libre de enfermedad que fue de 17% vs 56% respectivamente, estas diferencias se repitieron en las otras patologías a estudio. En otra revisión en pacientes con cáncer de mama metastásico sometidas a QAD encontraron que la

inmunodepresión prolongada en pacientes que no habían obtenido respuesta completa al tratamiento se correlacionaba con alto índice de progresión ⁷¹.

En 38 pacientes diagnosticadas de carcinoma de ovario estadios IIIB y IV sometidas a autotransplante se objetivó que un período prolongado de recuperación del número adecuado de CD3+, CD4+ y CD8+ son marcadores independientes de tiempo a la progresión y supervivencia global ⁷². En cambio esta norma no se cumple en un estudio publicado en linfomas no-Hodgkin donde a pesar de que un alto número de CD34+ se correlacionaba con más rápida recuperación del período de aplasia, no se encontró relación del resto de los parámetros con la supervivencia ⁷³.

Después de haber revisado los conocimientos actuales respecto al tema que nos ocupa, consideramos interesante poder evaluar por primera vez a un número importante de pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo y metastásico sometidas a QAD con autotransplante de células progenitoras hematopoyéticas e intentar responder con nuestra propia experiencia a las preguntas que como ya hemos visto todavía no tienen respuesta.

Para el esclarecimiento de estas cuestiones se han planteado los siguientes objetivos:

- Determinar las características de la recuperación inmunológica tras la QAD en pacientes con carcinoma de mama avanzado y ver el tiempo de recuperación de cada uno de los parámetros a estudio.
- Determinar si existe relación entre el estadio de la enfermedad y el tiempo de recuperación de cada uno de los parámetros a estudio.
- Determinar si existe relación entre el producto reinfundido (CD34) y la recuperación de cada uno de los parámetros a estudio.

- Determinar si existe relación entre la cantidad de CD34 y el estadio de la enfermedad.
- Determinar si existe relación entre el valor de alguno de los parámetros inmunológicos medidos y la evolución de la enfermedad de las pacientes.
- Determinar si existe relación entre el valor de alguno de los parámetros inmunológicos medidos y la supervivencia de las pacientes.

III- PACIENTES Y METODOS

1. PACIENTES

1.1 UNIVERSO POBLACIONAL

El Hospital Clínico Universitario de Zaragoza es un hospital de la red pública de hospitales del SALUD (Servicio Aragonés de Salud). Está vinculado a la Facultad de Medicina de Zaragoza. La Comunidad Autónoma de Aragón se divide en 4 sectores sanitarios en la provincia de Zaragoza (Zaragoza 1, 2 y 3 y sector Calatayud) y los sectores de Huesca, Barbastro, Teruel y Alcañiz.

El universo poblacional comprende la población rural y urbana adscrita al sector 3 y al sector de Calatayud en la provincia de Zaragoza. La población urbana corresponde a los barrios de Delicias, Oliver, Bombarda-Monsalud, Miralbueno y Valdefierro. Incluye también los barrios rurales situados al oeste del núcleo urbano: Casetas, Garrapinillos, Monzalbarba y Alfocea. La población rural corresponde a la mitad occidental de la provincia de Zaragoza y comprende las comarcas de Cinco Villas, Ribera del Ebro, Moncayo, Calatayud y Daroca. Se trata en general de población dispersa, con tres núcleos importantes de población.

La población urbana del Área, representa el 39.3% de la misma mientras que la población rural representa el 60.7%. El sector de Calatayud representa el 18.67% de la población.

Las características de la distribución por edades y sexos de la población del Área de Salud, muestran un marcado carácter regresivo, con una morfología de la pirámide poblacional en forma de hucha con un alto índice de envejecimiento siendo superior al 18%.

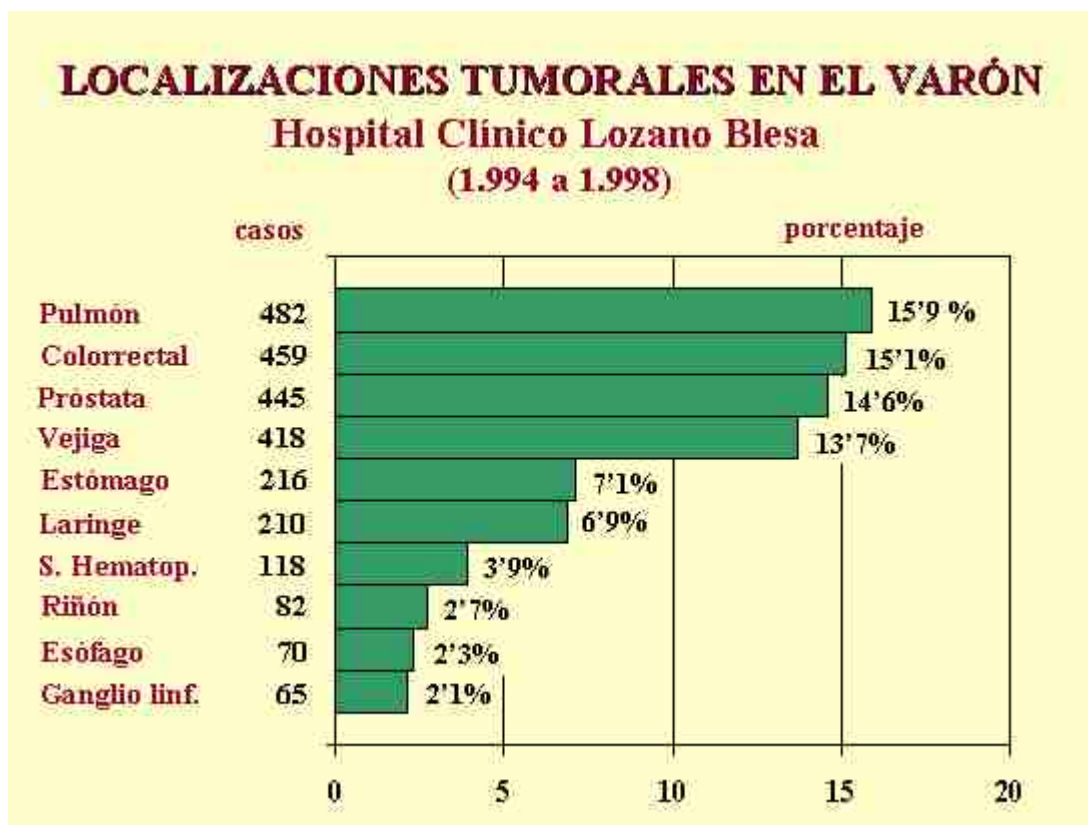
La evolución de la población en los últimos años refleja el alto índice de emigración urbana, con una progresiva despoblación de las zonas rurales, excepto en algunos núcleos urbanos y en la comarca de la ribera del Ebro.

La esperanza de vida al nacer en la provincia de Zaragoza es de 77 años, menor que en la Comunidad Autónoma (77,7 años). Hay una importante diferencia entre varones (73,7 años) y mujeres (80,2 años).

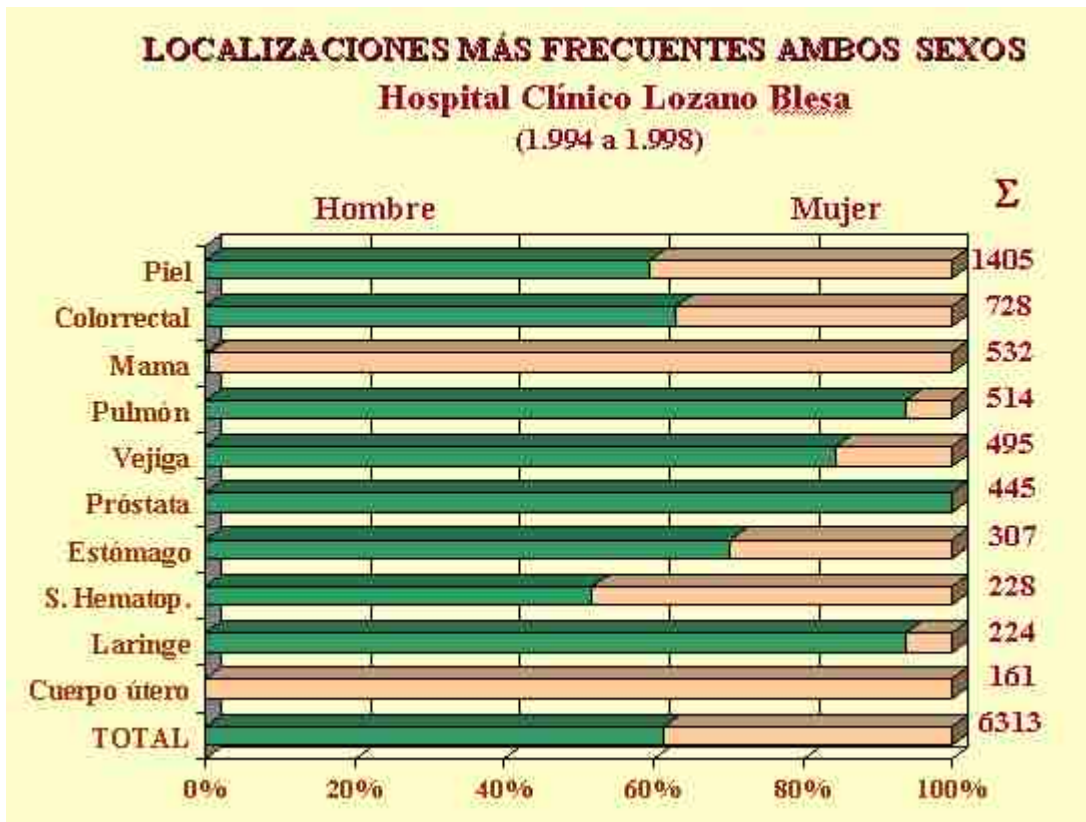


El Hospital Clínico Lozano Blesa cuenta con un registro de tumores desde el año 1.989. Disponemos de los siguientes datos sobre la incidencia del cáncer:

- Tasa de incidencia anual global: 428'6 por 100.000 h.
- Tasa de incidencia sin localización cutánea: 333'2 por 100.000 h.







El Hospital Clínico Universitario de Zaragoza es también centro de referencia para prestar asistencia especializada para toda la Comunidad Autónoma de Aragón y las provincias de Soria y la Rioja en los siguientes casos:

- Para Aragón: litotricia, radioterapia (acelerador de electrones) e inmunología.
- Para la provincia de Zaragoza. Alergología para adultos.
- Para las provincias de Soria y de Logroño: neurocirugía, cirugía vascular (patología arterial y venosa complicada), cirugía plástica (excepto cirugía estética u quemados), vitrectomías, litotricia, radioterapia (acelerador de electrones) y pruebas de hemodinámica cardiaca.

1.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN. UNIVERSO MUESTRAL

Sobre el Universo descrito se consideraron como candidatas a estudio aquellas pacientes diagnosticadas de carcinoma de mama metastásico o localmente avanzado (mujeres con estadio II-III o bien carcinoma inflamatorio) sometidas a tratamiento con quimioterapia de altas dosis y rescate de células progenitoras de sangre periférica entre octubre de 1995 y diciembre de 2003.

Los criterios de inclusión han sido:

- Edad entre 18 y 65 años.
- Diagnóstico histológico documentado de carcinoma de mama.
- Karnofsky ≥ 80 % (ECOG ≥ 1).
- Pacientes con estadio II-III-IV y carcinoma inflamatorio de mama.
- Adecuada función hepática y renal.
- Ausencia de enfermedades graves concomitantes.
- Ausencia de enfermedades o procesos intercurrentes que pudieran influir de forma significativa en los resultados como inmunodeficiencias y pacientes que precisan tratamiento prolongado con corticoides.
- Ausencia de enfermedad progresiva mientras recibían la quimioterapia pretransplante.
- Consentimiento informado del paciente por escrito.

Se excluyeron del estudio las pacientes que fallecieron durante el trasplante y en el periodo postransplante precoz (considerándose dicho período el de un mes tras la fecha de reinfusión de CD34).

1.3 REGIMEN DE TRATAMIENTO

Todas las pacientes fueron tratadas con 3-6 ciclos de quimioterapia de inducción con esquemas estándar. Posteriormente se realizó la Leucaféresis exigiéndose un mínimo de 2×10^6 células/Kg. CD34 (+). El régimen de intensificación fue STAMP-V (Ciclofosfamida $1,5 \text{ g/m}^2/\text{día}$; Carboplatino $200 \text{ mg/m}^2/\text{día}$; y Thiotepa $125 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ en los días -6, -5, -4 y -3) en las pacientes con carcinoma de mama localmente avanzado y STAMP-V con Taxol a dosis de 600 mg/m^2 en las pacientes con enfermedad metastásica.

Todas las pacientes recibieron factores estimulantes de colonias tras la reinfusión de stem cell de sangre periférica y profilaxis con antibióticos, antifúngicos y antivirales según protocolo, así como los requerimientos transfusionales precisos tanto de hematíes como de plaquetas durante el período postransplante.

1.4 CRITERIOS DE RESPUESTA

La respuesta al tratamiento fue definida como:

- Respuesta completa: no existe evidencia de enfermedad.
- Respuesta parcial: disminución de al menos el 50% del tamaño de las lesiones.
- Progresión: aumento mayor del 25% del tamaño de las lesiones o aparición de nuevas lesiones.

La supervivencia global fue medida desde el día de la reinfusión de CD34 hasta el día del fallecimiento. La supervivencia libre de progresión fue definida como el tiempo desde la reinfusión de CD34 hasta la fecha de la progresión o recidiva de la enfermedad.

1.5 SEGUIMIENTO

Conjuntamente se realizó el seguimiento propio de la enfermedad dependiendo del estadio en cada paciente, según pauta del Servicio.

Se realizaron mediciones seriadas de la función inmune (número de Linfocitos totales, número total y porcentual de Linfocitos CD3, CD4, CD8, cociente CD4/CD8, Linfocitos NK, linfocitos B e Ig G, IgA, Ig M, Ig E) a todas las pacientes tanto previamente al trasplante como posteriormente (trimestralmente el primer año, cada 6 meses el segundo año y anuales hasta progresión, recidiva o fallecimiento), tomando como valores de referencia los validados para el Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” de Zaragoza (Tabla 1).

PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS	VALORES NORMALES
Linfocitos Totales	1200 - 4000 mil/mm ³
Linfocitos T (CD3)	65 - 80 %
Linfocitos T cooperadores (CD4)	40 - 50 %
Linfocitos T supresores (CD8)	26 - 30 %
Linfocitos T cooperadores mm ³	500 - 800 mm ³
Linfocitos T supresores mm ³	250 - 800 mm ³
Cociente CD4/CD8	1,5 - 2 %
Linfocitos NK	5 - 10 %
Linfocitos B	10 - 15 %
Inmunoglobulina G	800 - 1800 MG/DL
Inmunoglobulina A	90 - 450 MG/DL
Inmunoglobulina M	65 - 265 MG/DL
Inmunoglobulina E	4 - 110 UI/ML

2. METODOS

2.1 ESTUDIO DE INMUNIDAD CELULAR.

Debe realizarse una preparación de las muestras para ser marcadas con monoclonales Coulter y leídas en un citómetro Epics Profile XL MCL.

Preparación de las muestras

Lisis de las células

- Solución de lisis: InmunoPrep
- Muestra: Sangre total heparinizada

Este reactivo viene preparado en tres componentes separados:

- Reactivo A, para la lisis de los hematíes.
- Reactivo B, para la estabilización de los leucocitos.
- Reactivo C, para la fijación de los anticuerpos monoclonales sobre la membrana de los linfocitos.

Composición de los reactivos:

- Solución A: ácido fórmico (1.2 ml/L).
- Solución B: Carbonato de sodio (6g/L), Cloruro de sodio (14.5 g/L), Sulfato de sodio (31.1 g/L).
- Solución C: paraformaldehído (10g/L).

El reactivo lisa los eritrocitos, lo que deja una mezcla de restos de hematíes y de leucocitos intactos, previamente marcados con un anticuerpo monoclonal. Las células quedan listas para ser leídas en el citómetro.

El reactivo lisa y fija el monoclonal a la membrana de los linfocitos. No es necesario centrifugar las células para lavarlas.

Material necesario:

- InmunoPrep
- Tubos de plástico desechables 12x75 mm
- Pipeta de 5-100 ml
- Q-Prep o Multi-Q-Prep
- Monoclonales
- Citómetro Epics Profile XL MCL

Marcaje de las células

- Por cada paciente preparar tantos tubos de plástico de 12x75 mm como combinaciones de monoclonales se vayan a emplear.
- Añadir un tubo más con un control isotópico.
- Pipetear 100 μ de sangre heparinizada en le fondo de cada tubo, teniendo cuidado de no dejar sangre por las paredes del tubo. Eventualmente se puede limpiar la pared del tubo de restos de sangre.
- Añadir 10 μ L de cada uno de los monoclonales que se vayan a utilizar, añadiendo un control isotópico por cada paciente.
- Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Colocar el tubo en el Q-Prep.
- Elegir el programa 30 segundos.
- El Q-Prep realiza la dispensación automática de los tres reactivos del InmunoPrep.
- Los linfocitos están listos para ser leídos en el citómetro

Una vez teñidas las células son analizadas en el citómetro de forma manual o automática. Previamente se han diseñado los protocolos de trabajo, ajustando la señal y la compensación de color. Cada histograma recoge las combinaciones de colores que tengamos seleccionadas. El primer histograma selecciona y distribuye las células en función de su tamaño y complejidad estructural, permitiendo distinguir entre leucocitos, linfocitos y monocitos. En este histograma es donde se selecciona la población a estudiar, generalmente los linfocitos. En el resto de los histogramas podemos hacer cuantas combinaciones queramos para comparar las distintas células marcadas. Es posible detectar células con un solo marcaje o con un marcaje doble. El empleo de un tercer color permite referir siempre las poblaciones estudiadas a un marcador común, como es el caso de CD3, en las poblaciones de linfocitos. Las subpoblaciones linfocitarias que nosotros estudiamos, se distribuyen de la siguiente manera en los histogramas que se muestran a continuación.

Histograma 1. Distribución de los Linfocitos B (CD19) y Linfocitos T (CD3).

CD19	
	CD3

Histograma 2. Distribución de los Linfocitos T4 (CD4) y Linfocitos T8 (CD8).

CD4	
	CD8

Histograma 3. Distribución de los Linfocitos NK (CD56).

	CD56

2.2 ESTUDIO DE INMUNIDAD HUMORAL

Para la determinación de las inmunoglobulinas IgG, IgM, IgE e IgA se ha utilizado el analizador de inmunoquímica de Beckman. Dicho aparato incluye un diluidor de razón fija (1/6), un dispersador de volumen fijo (600 microlitros) que permite la cuantificación de proteínas por nefelometría cinética, la fácil detección de exceso de antígeno, junto con los equipos de reactivos de Beckman.

El analizador consta de: un sistema óptico con una lámpara de cuarzo-yodo, una serie de lentes condensadores, un filtro de banda ancha, un modulador óptico que proporciona un haz de luz con una longitud de onda entre 400 y 620 nm, un sistema electrónico y un microcomputador.

El aparato ofrece sobre los otros sistemas de detección de proteínas las siguientes ventajas: sencillez, velocidad, reproductibilidad, detección automática de exceso de antígeno, supresión de la necesidad de utilizar blancos, gran sensibilidad y calibración automática.

Todas las muestras (sueros y orinas) y los calibradores son diluidos con el diluidor de razón fija para obtener las siguientes diluciones: 1/6, 1/36, 1/216, utilizando suero fisiológico como disolvente.

En la cubeta de inyección del analizador se deposita con el dispensador 600 microlitros de PBS y luego con la pipeta se inyecta sucesivamente, siguiendo las instrucciones del aparato, así 42 microlitros de la muestra, diluida al 1/36, para la IgA, IgM y diluida al 1/216 para la IgG. Posteriormente, se inyectan 42 microlitros del respectivo antisuero de origen caprino.

El aparato proporciona una lectura automática que queda reflejada en lector alfa numérico en mg/dl.

2.3. ANALISIS ESTADISTICO

Se diseñó una base de datos en Acces 2000 con las variables de interés y las características de las pacientes analizándose con el paquete estadístico SPSS versión 10.0.

2.3.1. Análisis descriptivo

De cada paciente se recogieron las siguientes variables:

- Demográficas (lugar de procedencia).
- Biográficas (edad, estadio al diagnóstico y al tratamiento, fecha de recidiva - progresión y/o fallecimiento, situación actual).
- De los parámetros a estudio: número de Linfocitos totales, número absoluto y porcentaje de Linfocitos CD3, CD4, CD8, cociente CD4/CD8, Linfocitos NK, linfocitos B y número absoluto de Ig G, IgA, Ig M e Ig E tanto previamente al trasplante como posteriormente y trimestralmente el primer año, cada 6 meses el segundo año y anuales hasta progresión, recidiva o fallecimiento.
- Número de células CD34 reinfundidas en el día 0 del trasplante.

Con los parámetros recogidos de cada paciente se realizó un análisis descriptivo de evolución y recuperación en el tiempo para todo el conjunto de la muestra calculando:

- Media y mediana de cada uno de los parámetros a estudio en cada momento del tiempo (pretratamiento, meses 0, 1, 3, 6,12 postratamiento y anualmente hasta recidiva, progresión o fallecimiento) en sus valores absolutos y porcentuales.

- Media y mediana del número absoluto de células CD34 reinfundidas.

Posteriormente se realizaron los mismos análisis descriptivos pero dividiendo a la muestra en varios grupos según distintos factores:

- Por un lado se han dividido a las pacientes entre aquellas con carcinoma de mama localmente avanzado (estadios II+III) y aquellas con carcinoma de mama metastásico (estadio IV).
- También se ha dividido a la muestra en dos grupos en función de si el número absoluto de células CD34 que habían recibido se encontraba por encima o por debajo de la mediana de las células reinfundidas.

2.3.2. Análisis comparativo

- Se han comparado todos los parámetros inmunológicos a estudio en todos los momentos del tiempo entre los dos subgrupos de pacientes en los que hemos dividido la muestra, tanto en dependencia del estadio (II+III vs IV) como en dependencia del número de CD34 reinfundidas y hemos visto si existía diferencias significativas en algún parámetro entre un grupo y otro.
- Se ha buscado si existía correlación entre la recuperación de alguno de los parámetros en algún momento del tiempo y el estadio de las pacientes (II+III vs IV) así como la posible correlación con el número de CD34 reinfundidas.
- Se ha buscado si existía relación entre alguno de los parámetros en el mes +1 y +3 y la supervivencia de las pacientes así como el tiempo a la progresión o recidiva.
- Por último se ha realizado un análisis multivariante de los datos que hemos considerado significativos en el estudio.

2.3.3 Test estadísticos

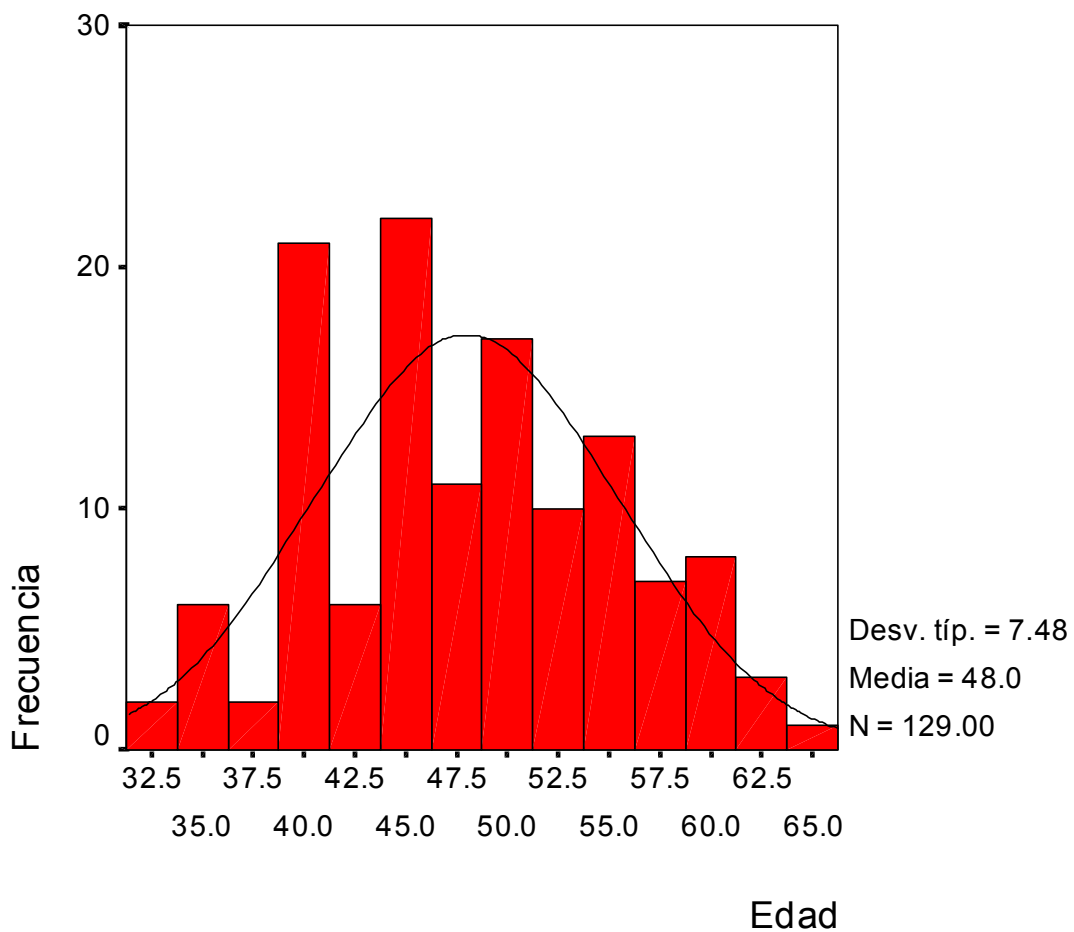
- Para cada parámetro se realizó el Test de Kolmogorov-Smirnov para una muestra. Si superaban dicho Test de normalidad se aplicó la prueba de la T para medias de muestras relacionadas; si no se podían considerar dentro de la normalidad se aplicó el Test de Wilcoxon para dos muestras relacionadas.
- Para la comparación de las medias para dos muestras independientes se ha utilizado la prueba de la U de Mann-Whitney.
- Para buscar correlación entre variables se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson.
- Las curvas de supervivencia se realizaron por el método de Kaplan-Meier y su comparación por el método de log-rank test.
- En el contraste de hipótesis para el rechazo de la hipótesis nula (H_0) se ha marcado el nivel de significación del 95% ($p < 0,05$).

IV- RESULTADOS

1. PACIENTES

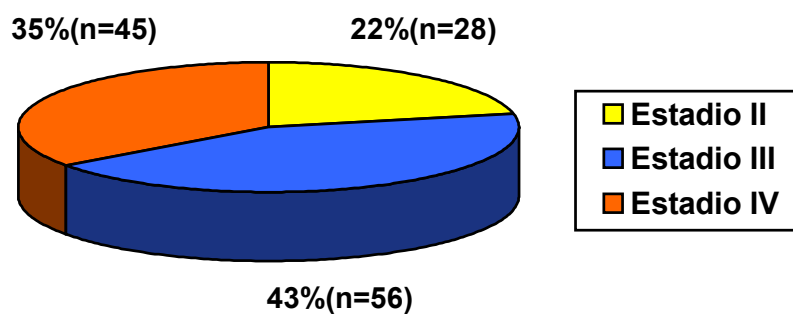
La muestra a estudio está constituida por 129 pacientes con una media de edad de 47,9 años, una desviación estándar de 7,4 y una mediana de edad de 47 años (rango 32-64).

EDAD



La distribución por estadios se muestra en la Figura 1:

Figura 1. Distribución por estadios al tratamiento.



En el momento del tratamiento los valores estadísticos de la edad en función del estadio se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores estadísticos de la edad en función del estadio.

Estadio	N	Media (edad)	Desv. Tip.
II	28	48,5000	6.0645
III	56	48,9107	8.1000
IV	45	46,4889	7.3782
Total	129	47.9767	7.4754

Se incluyeron las pacientes sometidas a Quimioterapia de altas dosis con rescate de células progenitoras de sangre periférica entre octubre de 1995 y diciembre de 2003. La distribución por años se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2. Distribución por el año del tratamiento

Año del tratamiento	Nº de pacientes
1995-1996	19
1997-1998	42
1999-2000	48
2001-2002	17
2003	3

2. PARAMETROS INMUNOLOGICOS

2.1 EVOLUCION DE LOS PARAMETROS INMUNOLOGICOS POSTRANSPLANTE

2.1.1 LINFOCITOS TOTALES

Tal como se expresa en las gráficas de las Figuras 2 y 3, se produce un descenso en el número total de linfocitos por mm^3 en el tercer mes tras el transplante, recuperándose la normalidad en más del 50% de las pacientes a partir de los 12 meses. Posteriormente el número de linfocitos va aumentando de manera progresiva estabilizándose en torno al cuarto año postransplante.

Figura 2. Evolución de la media y mediana de Linfocitos/ mm^3 en el tiempo.

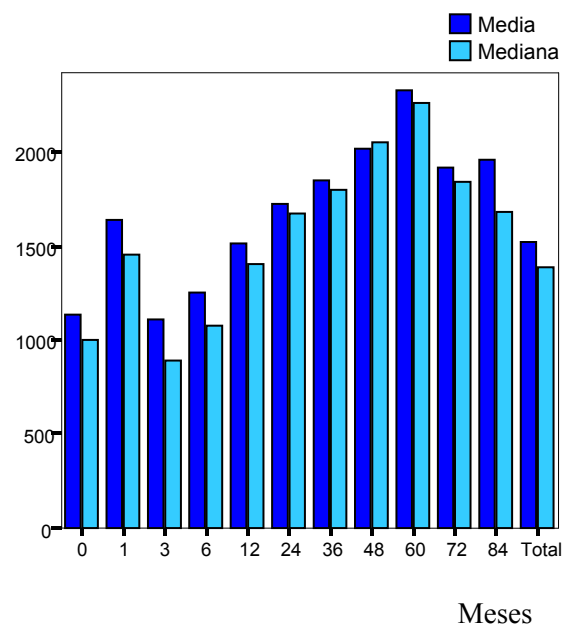
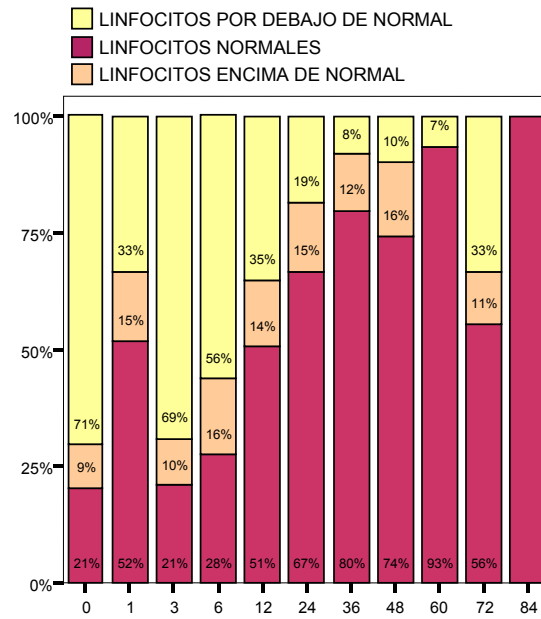


Figura 3. Porcentaje de Linfocitos por encima, por debajo y dentro de parámetros normales (entre 1200 – 4000/mm³) en el tiempo.



2.1.2 LINFOCITOS T (CD3)

Tal como se expresa en las gráficas de las Figuras 4 y 5 se produce un descenso en el número total de linfocitos CD3/mm³ a partir del tercer mes tras el transplante, recuperándose la normalidad a partir de los 12 meses. Posteriormente el número absoluto de linfocitos T va aumentando de manera progresiva estabilizándose en torno al cuarto año postransplante. La media del porcentaje de linfocitos T dentro del total de linfocitos se mantiene en límites normales durante todo el seguimiento (Figura 6).

Figuras 4 y 5. Evolución de la media y mediana de Linfocitos T (recuento absoluto/mm³ y porcentual) en el tiempo.

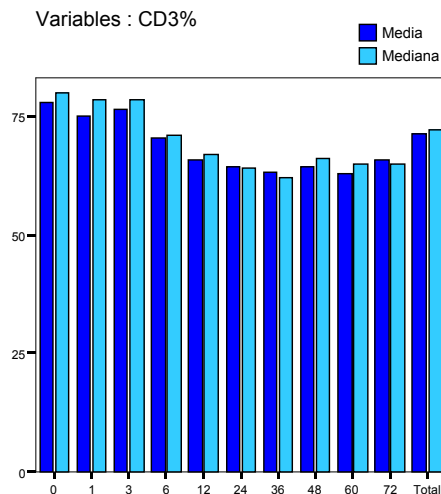
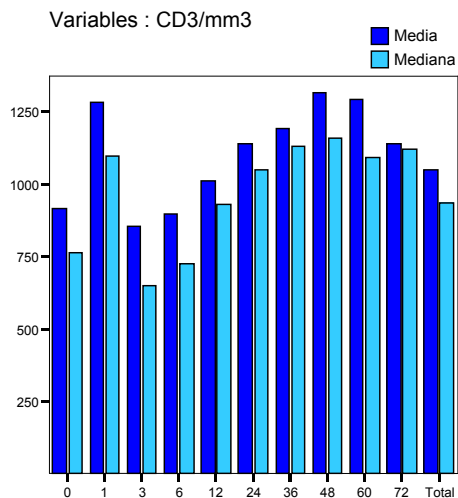
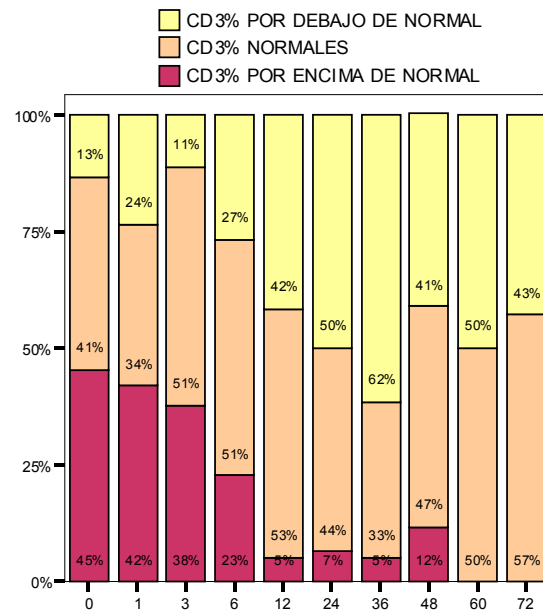


Figura 6. Porcentaje de Linfocitos T (CD3) por encima, por debajo y dentro de parámetros normales (65-80 % de los Linfocitos totales) en el tiempo.



2.1.3 LINFOCITOS CD4

Tal como se expresa en las gráficas de las Figuras 7 y 8, se produce un descenso en el número de linfocitos CD4 totales desde el primer mes, recuperándose la normalidad a partir de los 24 meses. Posteriormente el número de linfocitos CD4 va aumentando de manera progresiva, estabilizándose en torno al cuarto año postransplante. Los valores porcentuales se encuentran por debajo de la normalidad en más del 85% de las pacientes durante todo el seguimiento (Figura 9).

Figuras 7 y 8. Evolución de la media y mediana de Linfocitos CD4 (recuento absoluto/mm³ y porcentual) en el tiempo

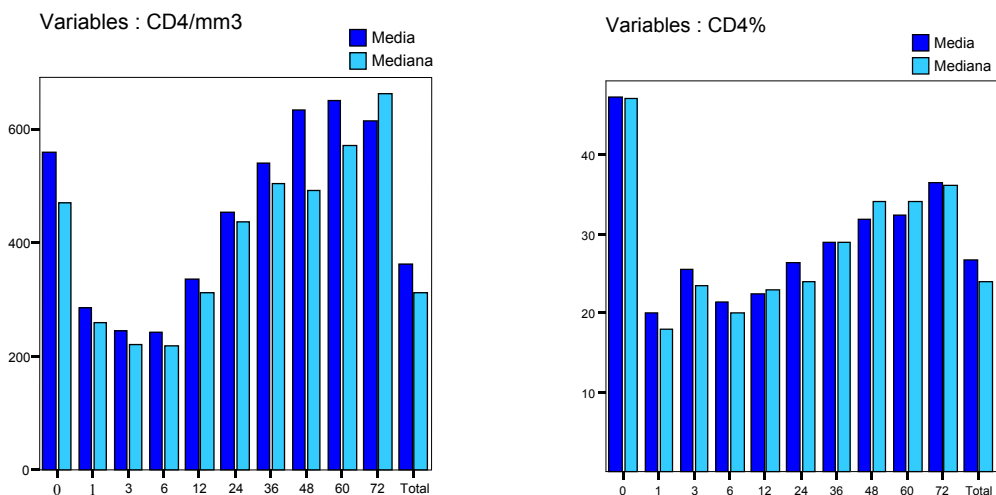
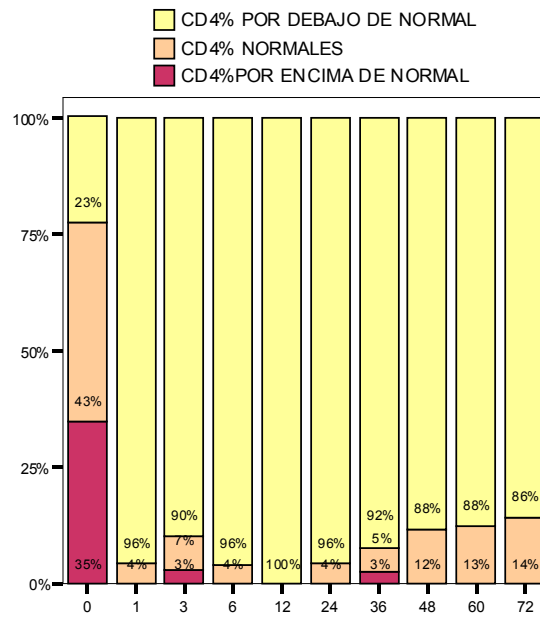


Figura 9. Porcentaje de Linfocitos CD4 por encima, por debajo y dentro de parámetros normales (40-50% de Linfocitos T) en el tiempo.



2.1.4 LINFOCITOS CD8

Tal como se expresa en las gráficas de las Figuras 10 y 11, se produce un pico en el número absoluto de linfocitos CD8 en el primer mes tras el trasplante, disminuyendo y retornando a valores normales a partir del tercer mes. El porcentaje de linfocitos CD8 respecto a los linfocitos T totales se encuentra elevado desde el primer mes tras el trasplante (en el 88% de las pacientes), manteniéndose por encima de valores normales en más del 50% de las pacientes hasta el quinto año de seguimiento (Figura 12).

Figuras 10 y 11. Evolución de la media y mediana de Linfocitos CD8 (recuento absoluto/ mm³ y porcentual) en el tiempo.

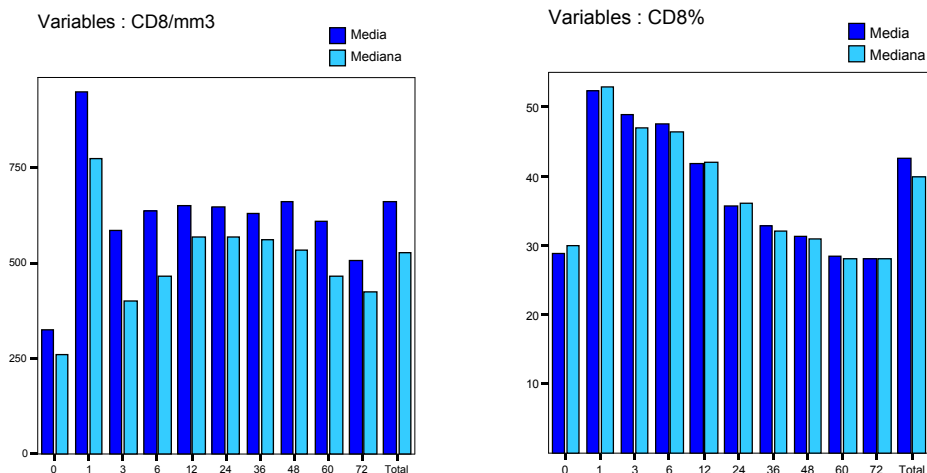
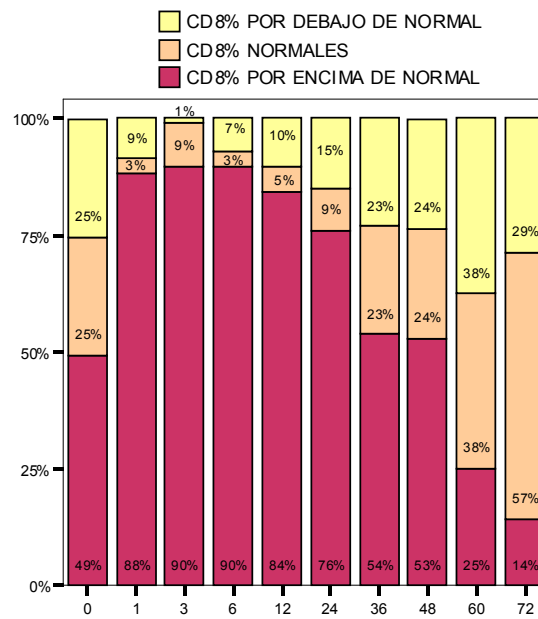


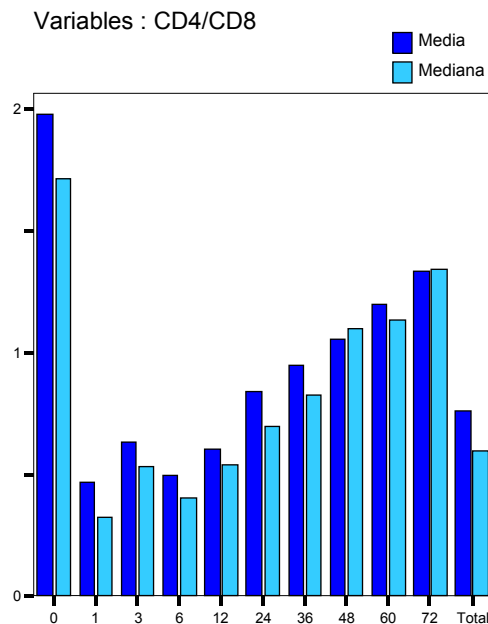
Figura 12. Porcentaje de Linfocitos CD8 por encima, por debajo y dentro de parámetros normales (26-30% de Linfocitos T) en el tiempo.



2.1.5 COCIENTE CD4/CD8

Tal como se expresa en la gráfica de la Figura 13, se produce un descenso en el cociente CD4/CD8 desde el primer mes tras el trasplante. Posteriormente el cociente va aumentando de manera progresiva, estabilizándose en torno al cuarto año postransplante, sin llegar a recuperar los valores normales (1,5-2) en ningún momento del seguimiento.

Figura 13. Evolución de la media y mediana de Cociente CD4/CD8 en el tiempo.



2.1.6 LINFOCITOS B

Tal como se expresa en las gráficas de las Figuras 14 y 15, se produce un descenso en el número absoluto de linfocitos B en el primer mes tras el transplante, volviendo a la normalidad a partir del sexto mes. Posteriormente el número de linfocitos B va aumentando de manera progresiva estabilizándose en torno al segundo año postransplante. El porcentaje de linfocitos B respecto a los linfocitos totales se encuentra disminuido desde el primer mes postransplante (en el 99% de las pacientes), manteniéndose por debajo de valores normales en más del 50% de las pacientes hasta primer año de seguimiento, posteriormente el porcentaje de linfocitos B se mantiene elevado durante todo el seguimiento (Figura 16).

Figuras 14 y 15. Evolución de la media y mediana de Linfocitos B (recuento absoluto/mm3 y porcentual) en el tiempo.

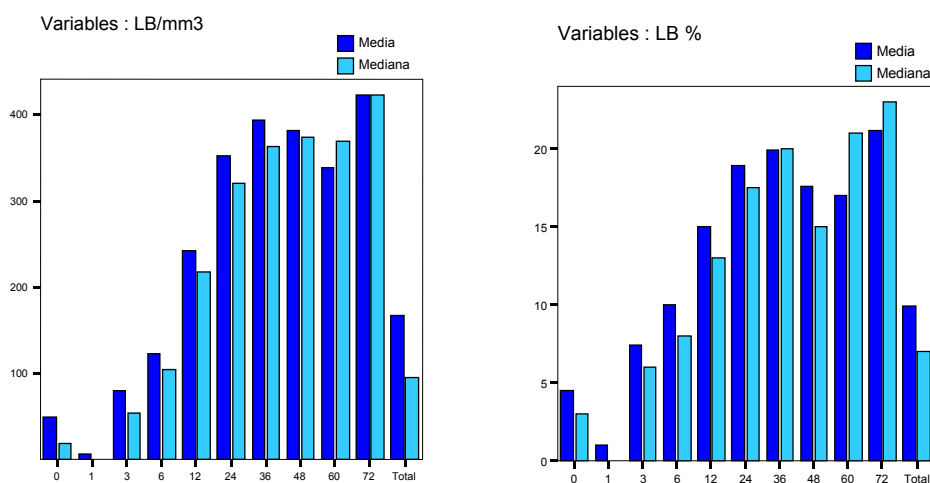
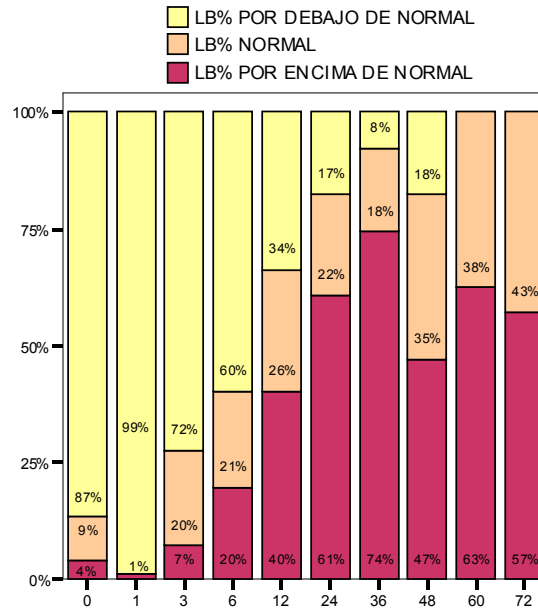


Figura 16. Porcentaje de Linfocitos B por encima, por debajo y dentro de parámetros normales (10-15% de Linfocitos totales) en el tiempo.



2.1.7 LINFOCITOS NK

Tal como se expresa en las gráficas de las Figuras 17 y 18 el número absoluto de linfocitos NK tras el transplante, se mantiene dentro de parámetros normales. El porcentaje de linfocitos NK disminuye por debajo de la normalidad en el primer mes tras el transplante en el 60% de las pacientes. Posteriormente, el porcentaje se normaliza y se mantiene estable durante todo el periodo de seguimiento (Figura 19).

Figuras 17 y 18. Evolución de la media y mediana de Linfocitos NK (recuento absoluto/mm3 y porcentual) en el tiempo.

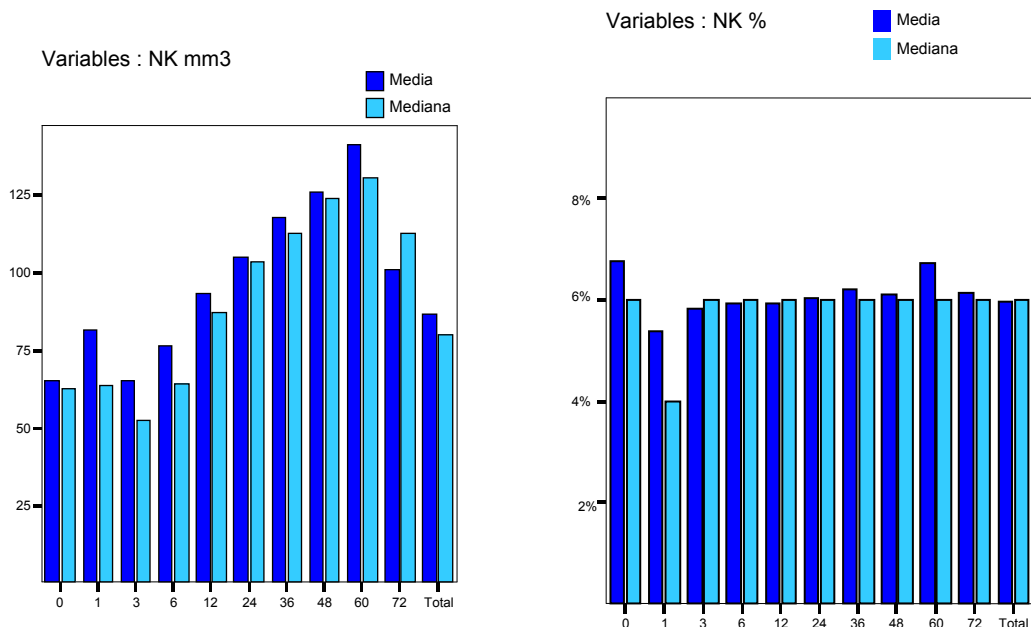
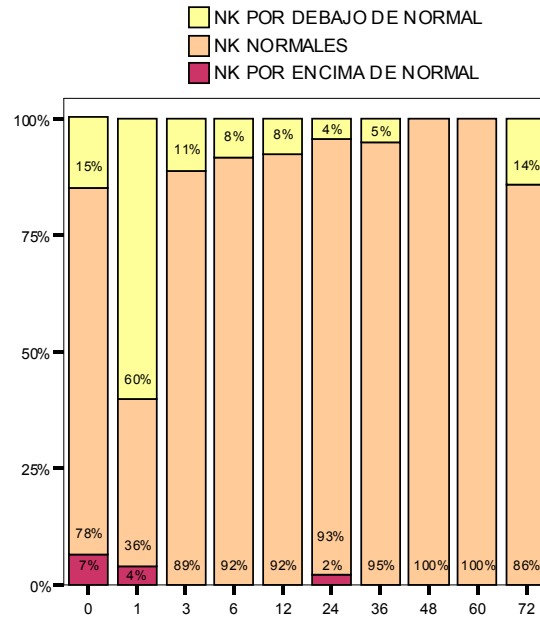


Figura 19. Porcentaje de Linfocitos NK por encima, por debajo y dentro de parámetros normales (5-10% de Linfocitos totales) en el tiempo.



2.1.8 INMUNOGLOBULINA G

Tal como se expresa en la gráfica de la Figura 20, la concentración de Inmunoglobulina G tras el transplante se mantiene dentro de límites normales en más del 50% de las pacientes a partir del primer mes postransplante (Figura 21).

Figura 20. Evolución de la media y mediana de la concentración de Inmunoglobulinas G en el tiempo.

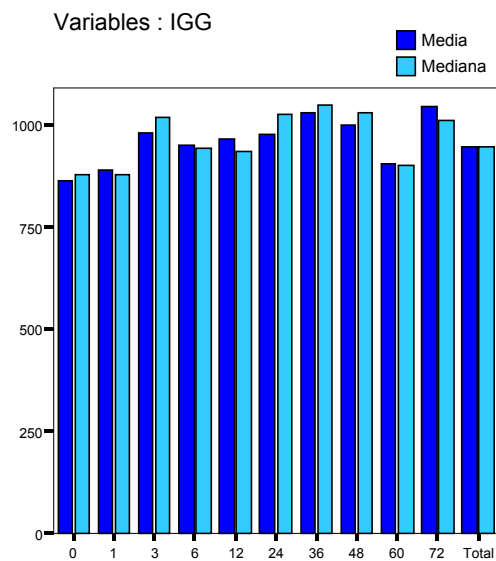
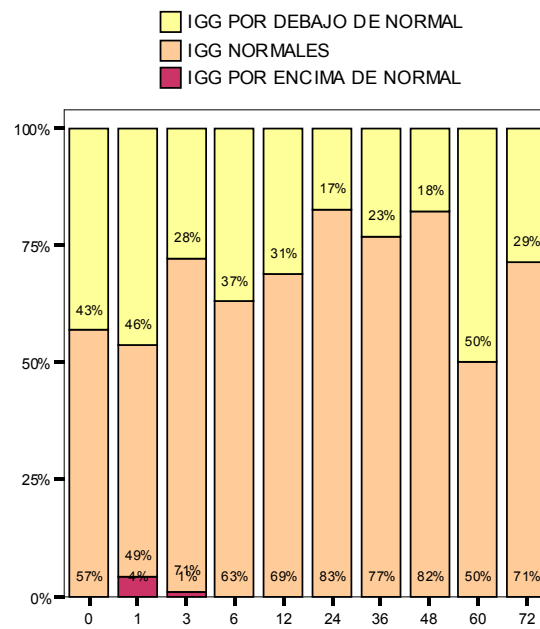


Figura 21. Porcentaje de pacientes con concentración de Inmunoglobulina G por encima, por debajo y dentro de parámetros normales (800-1800 mg/DL) en el tiempo.



2.1.9 INMUNOGLOBULINA A

Tal como se expresa en la gráfica de la Figura 22, se produce un leve descenso en la concentración de Inmunoglobulina A en el tercer mes tras el transplante, pero manteniéndose dentro de límites normales durante todo nuestro seguimiento en más del 65% de las pacientes (Figura 23).

Figura 22. Evolución de la media y mediana de la concentración de Inmunoglobulina A en el tiempo.

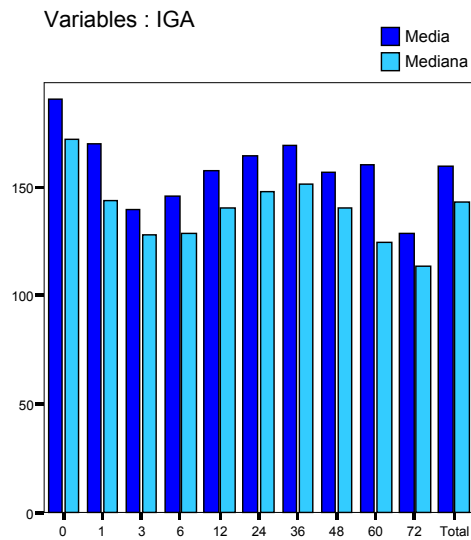
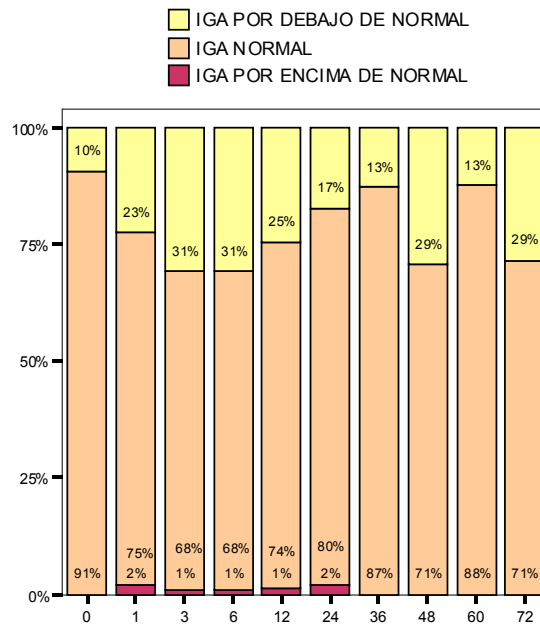


Figura 23. Porcentaje de pacientes con concentración de Inmunoglobulina A por encima, por debajo y dentro de parámetros normales (90-450 mg/DL) en el tiempo.



2.1.10 INMUNOGLOBULINA M

Tal como se expresa en la gráfica de la Figura 24, se produce un leve descenso en la concentración de Inmunoglobulina M en el primer mes tras el transplante, recuperándose a partir del tercer mes y manteniéndose dentro de límites normales durante el resto de nuestro seguimiento en mas del 50% de las pacientes (Figura 25).

Figura 24. Evolución de la media y mediana de la concentración de Inmunoglobulinas M en el tiempo.

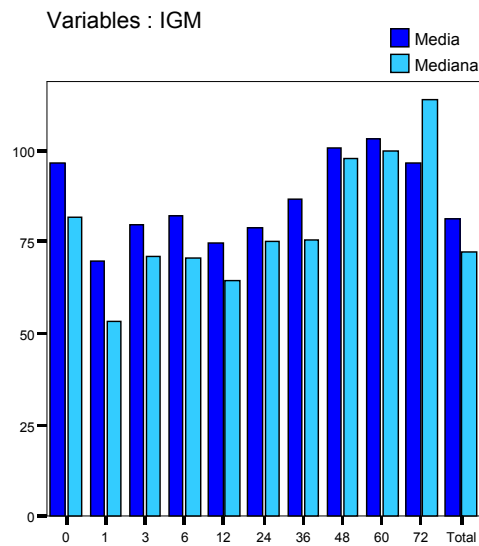
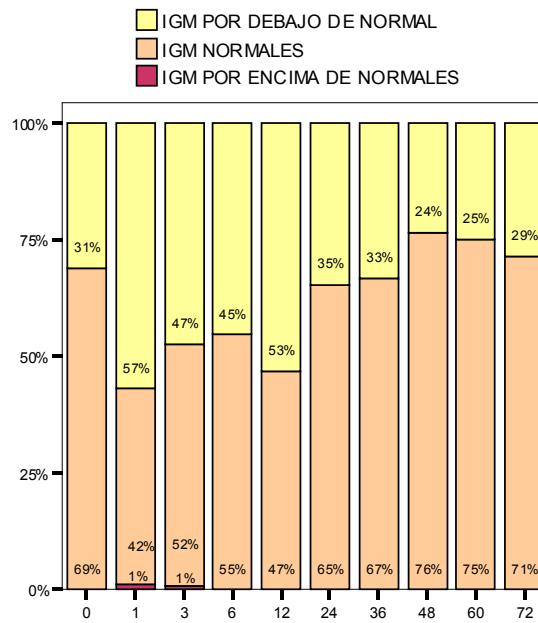


Figura 25. Porcentaje de pacientes con concentración de Inmunoglobulina M por encima, por debajo y dentro de parámetros normales (65-265 mg/DL) en el tiempo.



2.1.11 INMUNOGLOBULINA E

Tal como se expresa en la gráfica de la Figura 26, la mediana de la concentración de Inmunoglobulinas E se mantiene dentro de límites normales durante todo nuestro seguimiento. Llama la atención el aumento de la media por encima de los parámetros normales a partir del mes 12 y hasta el cuarto año, debido a valores absolutos altos hallados en el 13- 38% de las pacientes en ese período de tiempo. En más del 55% de las pacientes los valores se mantienen dentro de la normalidad durante todo el seguimiento (Figura 27).

Figura 26. Evolución de la media y mediana de la concentración de Inmunoglobulina E en el tiempo.

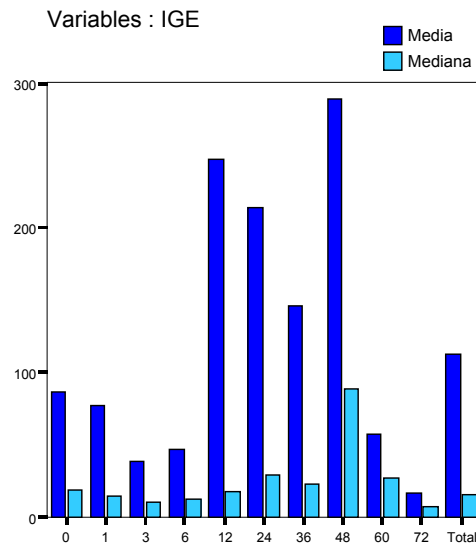
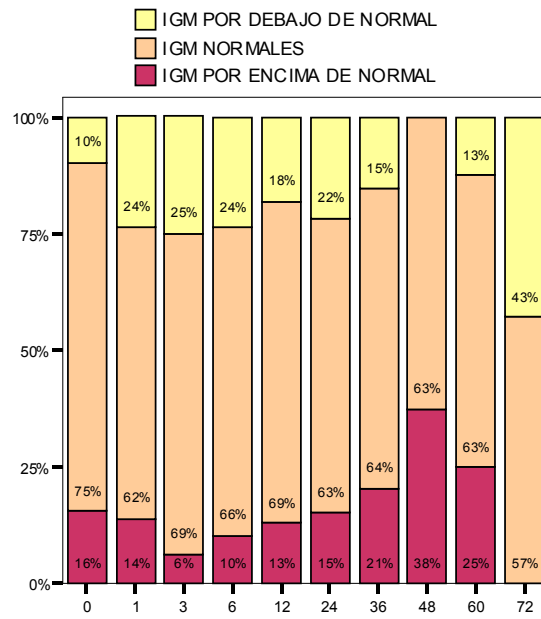


Figura 27. Porcentaje de pacientes con concentración de Inmunoglobulina E por encima, por debajo y dentro de parámetros normales (4-110 mg/DL) en el tiempo.



2.1.12 RESUMEN DE LA RECUPERACIÓN POR MESES DE LOS PARAMETROS INMUNOLOGICOS EN EL PERIODO POSTRANSPLANTE

MESES	0	+1	+3	+6	+12	+24	+36	+48	+60	+72
Linfocitos totales	↓	=	↓	↓	=	=	=	=	=	=
Linf.T(CD3 mm3)	=	=	↓	↓	=	=	=	=	=	=
Linf.T (CD3 %)	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Linf. CD4 mm3	=	↓	↓	↓	↓	↓	=	=	=	=
Linf. CD4 %	=	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Linf CD8 mm3	=	↑	=	=	=	=	=	=	=	=
Linf. CD8 %	=	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	=	=
CD4 / CD8	=	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Linf B mm3	↓	↓	↓	=	=	=	=	=	=	=
Linf. B %	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Linf. NK mm3	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Linf NK %	=	↓	=	=	=	=	=	=	=	=
Ig G	=	↓	=	=	=	=	=	=	=	=
Ig A	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Ig M	=	↓	=	=	=	=	=	=	=	=
Ig E	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=

↑ Parámetro con mediana por encima del límite alto del rango normal.

= Parámetro con mediana dentro del límite alto del rango normal.

↓ Parámetro con mediana por debajo del límite alto del rango normal.

En el gráfico anterior se muestra como se produce una alteración en casi todos los parámetros inmunológicos en el mes +1 tras el trasplante, excepto los Linfocitos totales, los Linfocitos T (CD3), Linfocitos NK/mm³, y las Inmunoglobulinas A y E que se encuentran en límites normales. El resto de los parámetros se encuentran disminuidos excepto los Linfocitos CD8 (en su valor absoluto y porcentual) que están aumentados.

A partir del primer mes tras el trasplante el resto de parámetros se va normalizando:

- Entre el primer y el tercer mes se normaliza el valor de los Linfocitos NK e Inmunoglobulinas.
- Entre el tercer y el sexto mes se normaliza el valor de los Linfocitos B/mm³, Linfocitos totales y CD3/mm³.

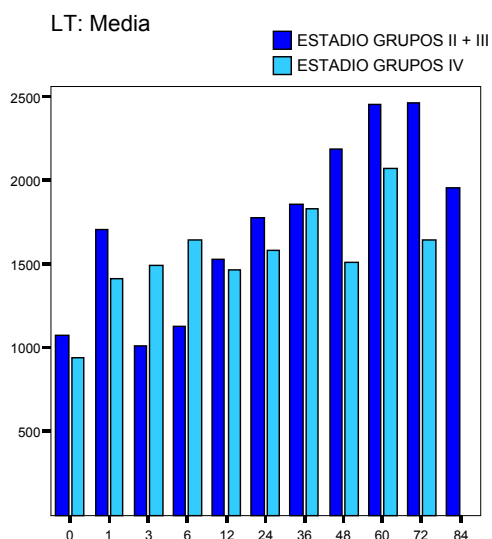
Posteriormente solamente persisten alterados a más de un año de seguimiento el porcentaje de Linfocitos B que está aumentado durante el resto del seguimiento, los Linfocitos CD4 (que permanece disminuido su porcentaje dentro del total de Linfocitos T hasta el 2^o año, y su valor absoluto durante todo el seguimiento), los Linfocitos CD8 en su porcentaje respecto al total de Linfocitos T que permanece elevado hasta el cuarto año de seguimiento y el valor del cociente CD4/CD8 que permanece disminuido durante todo el seguimiento, como consecuencia lógica de las alteraciones en los Linfocitos CD4 y CD8.

2.2 EVOLUCION DE LOS PARAMETROS INMUNOLOGICOS POR SUBGRUPOS.

2.2.1 EVOLUCION POR ESTADIOS

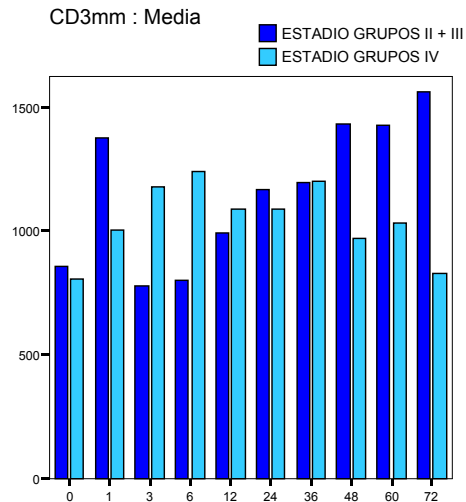
Se ha dividido cada uno de los parámetros inmunológicos en dos subgrupos en dependencia del estadio (pacientes con estadio II+III y pacientes con estadio IV de carcinoma de mama) y se ha comparado la media de cada valor en cada momento del tiempo.

LINFOCITOS TOTALES



MESES	ESTADIO GRUPOS (medias)	
	II + III	IV
0	1075	945
1	1706	1413
3*	1010	1492
6*	1127	1642
12	1531	1471
24	1782	1580
36	1858	1830
48*	2189	1515
60	2458	2072
72	2470	1645

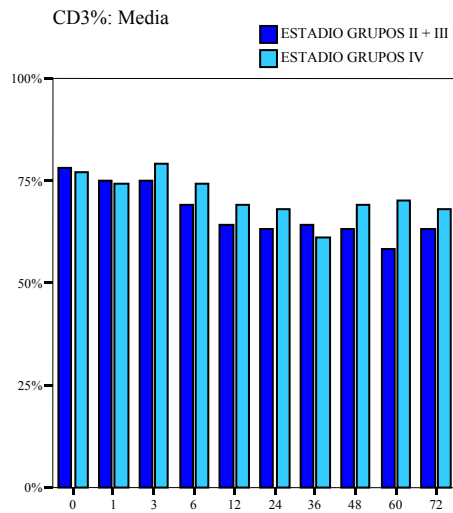
* En los meses +3,+6 y +48, existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el número total de Linfocitos entre los dos subgrupos.

LINFOCITOS T (CD3/mm³)

	ESTADIO GRUPOS	
	II + III	IV
0	854	804
1	1371	1002
3*	775	1178
6*	799	1241
12	988	1085
24	1166	1087
36	1194	1200
48	1430	967
60	1423	1028
72	1562	828

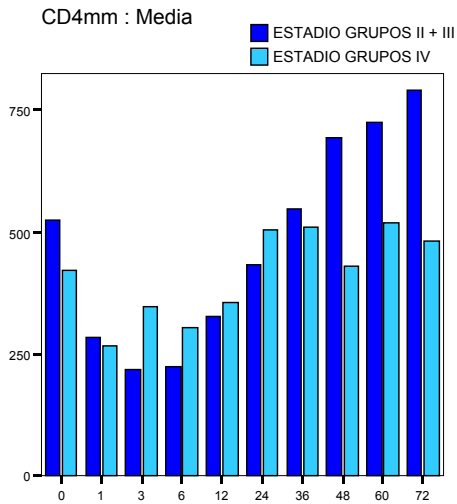
* En los meses +3 y +6, existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el número total de Linfocitos CD3 entre los dos subgrupos.

LINFOCITOS T (% CD3)



	ESTADIO GRUPOS	
	II + III	IV
0	78	77
1	75	74
3	75	79
6	69	74
12	64	69
24	63	68
36	64	61
48	63	69
60*	58	70
72	63	68

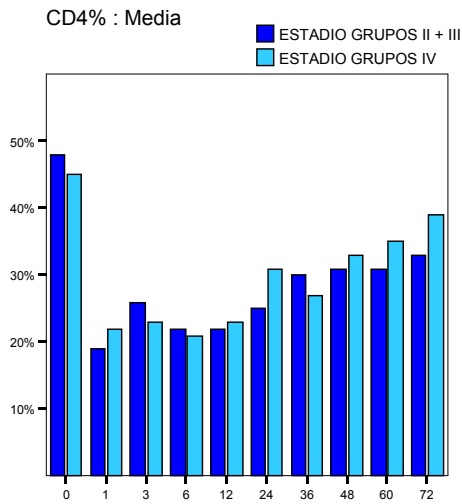
* En el mes + 60 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el porcentaje de Linfocitos CD3 entre los dos subgrupos.

LINFOCITOS CD4 (mm3)

	ESTADIO GRUPOS	
	II + III	IV
0	526,0	420,8
1	283,7	268,6
3*	219,9	346,8
6*	225,4	304,6
12	328,4	355,7
24	433,7	505,4
36	547,5	512,2
48	694,5	431,4
60	724,2	519,4
72	792,7	481,1

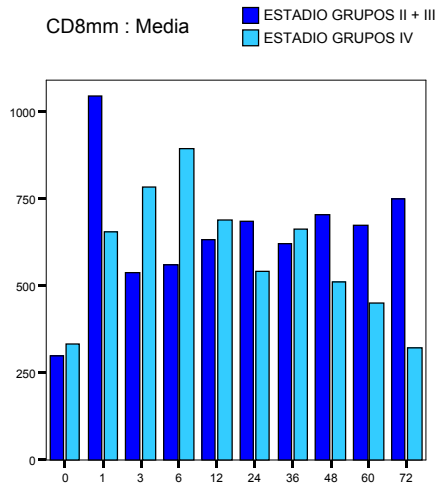
* En los meses +3 y +6, existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el número total de Linfocitos CD4 entre los dos subgrupos.

LINFOCITOS CD4 (%)



	ESTADIO GRUPOS	
	II + III	IV
0	48	45
1	19	22
3	26	23
6	22	21
12	22	23
24*	25	31
36	30	27
48	31	33
60	31	35
72	33	39

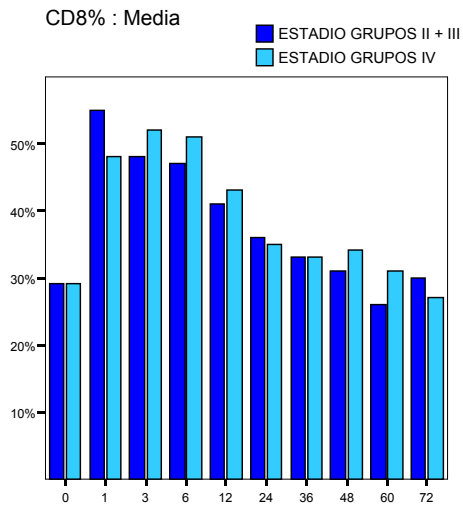
* En el mes + 24 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el porcentaje de Linfocitos CD4 entre los dos subgrupos.

LINFOCITOS CD8 (mm3)

	ESTADIO GRUPOS	
	II + III	IV
0	300,9	334,8
1*	1048,0	657,6
3*	537,4	783,5
6*	562,5	894,3
12	634,8	689,3
24	686,0	543,4
36	622,7	664,7
48	707,1	512,7
60	675,0	452,7
72	749,3	325,3

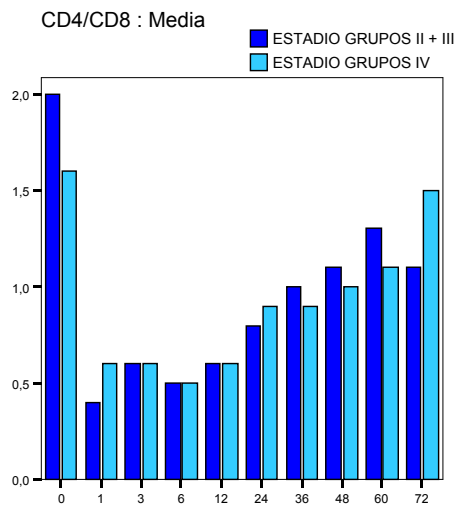
* En los meses +1,+3 y +6, existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el número total de Linfocitos CD8 entre los dos subgrupos.

LINFOCITOS CD8 (%)



	ESTADIO GRUPOS	
	II + III	IV
0	29	29
1	55	48
3	48	52
6	47	51
12	41	43
24	36	35
36	33	33
48	31	34
60	26	31
72	30	27

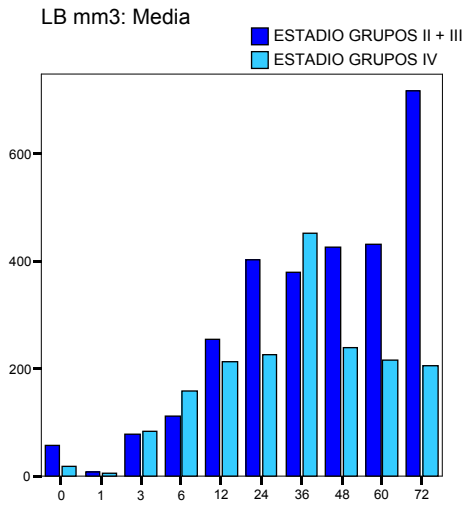
* No se ha encontrado en ningún mes diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el porcentaje de Linfocitos CD8 entre los dos subgrupos.

COCIENTE LINFOCITOS CD4/CD8.

	ESTADIO GRUPOS	
	II + III	IV
0	2,0	1,6
1	,4	,6
3	,6	,6
6	,5	,5
12	,6	,6
24*	,8	,9
36	1,0	,9
48	1,1	1,0
60	1,3	1,1
72	1,1	1,5

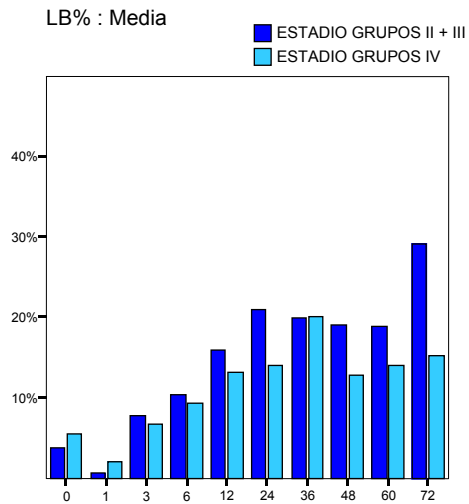
* En el mes + 24 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el cociente CD4/CD8 entre los dos subgrupos.

LINFOCITOS B (mm3).



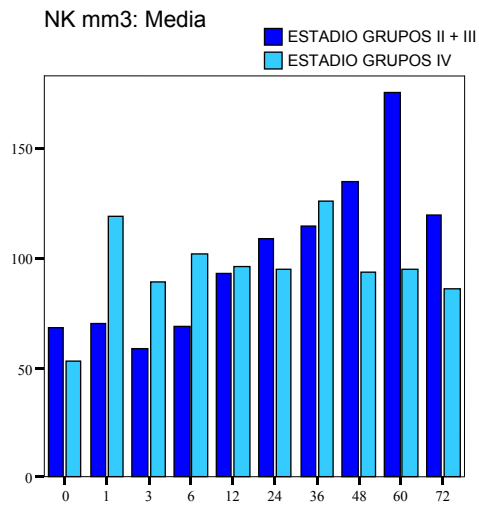
	ESTADIO GRUPOS	
	II + III	IV
0	62,3	20,8
1	14,2	8,6
3	75,4	83,8
6	101,3	160,6
12	232,0	215,7
24	412,1	220,4
36	385,6	429,2
48	440,5	235,4
60	445,2	210,4
72	692,7	180,1

* En el mes + 24 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el número de Linfocitos B entre los dos subgrupos.

LINFOCITOS B (%)

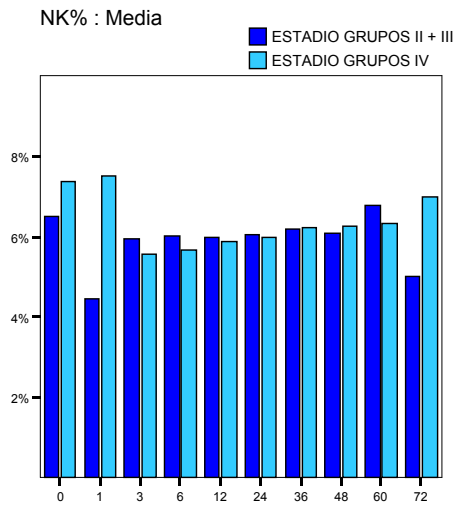
	ESTADIO GRUPOS	
	II + III	IV
0	3,74	5,42
1	,57	1,99
3	7,68	6,67
6	10,28	9,33
12	15,81	13,11
24*	20,88	13,92
36	19,83	20,11
48	19,08	12,75
60	18,80	14,00
72	29,00	15,25

* En el mes + 24 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el porcentaje de Linfocitos B entre los dos subgrupos.

LINFOCITOS NK (mm³).

	ESTADIO GRUPOS	
	II + III	IV
0	64,51	51,39
1	70,46	129,50
3*	56,94	86,56
6*	60,01	98,68
12	82,98	90,88
24	115,06	88,00
36	122,20	139,22
48	130,08	83,25
60	172,80	87,33
72	130,00	61,00

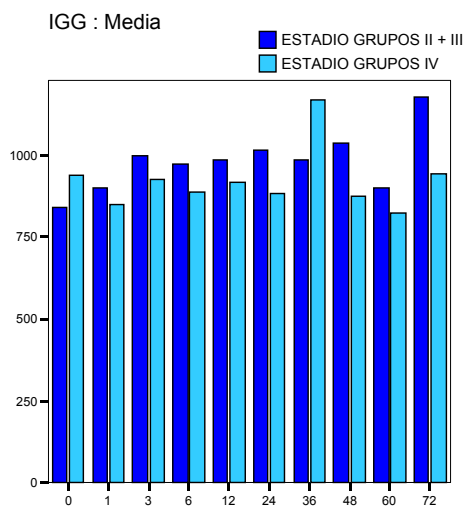
* En los meses +3 y +6 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el número total de Linfocitos NK entre los dos subgrupos.

LINFOCITOS NK (%).

	ESTADIO GRUPOS	
	II + III	IV
0	6,51	7,39
1	4,46	7,50
3	5,94	5,56
6	6,01	5,68
12	5,98	5,88
24	6,06	6,00
36	6,20	6,22
48	6,08	6,25
60	6,80	6,33
72	5,00	7,00

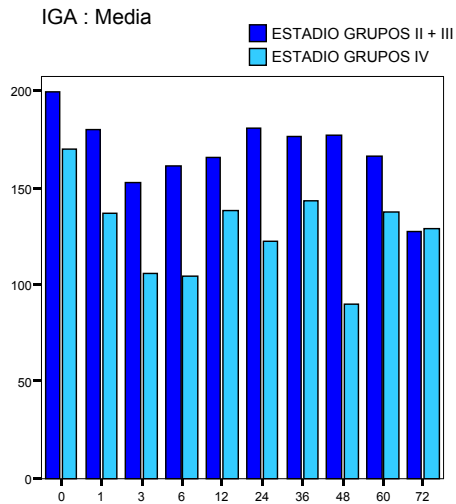
* No se ha encontrado en ningún mes diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el porcentaje de Linfocitos NK entre los dos subgrupos.

INMUNOGLOBULINA G.



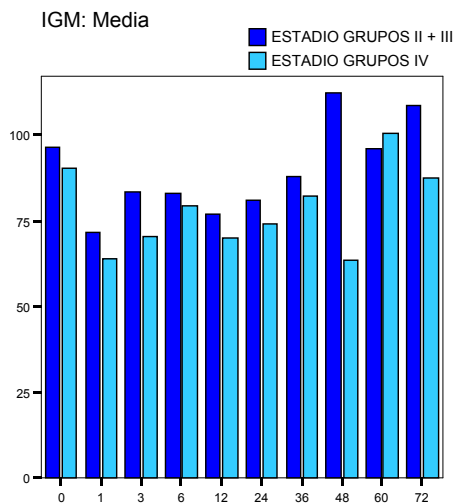
ESTADIO GRUPOS		
	II + III	IV
0	841,24	939,39
1	898,60	850,14
3	998,10	927,33
6	972,25	886,14
12	984,36	918,13
24	1015,48	881,54
36	985,50	1168,44
48	1038,15	875,00
60	900,00	825,33
72	1179,33	942,75

* No se ha encontrado en ningún mes diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la concentración de Inmunoglobulina G entre los dos subgrupos.

INMUNOGLOBULINA A.

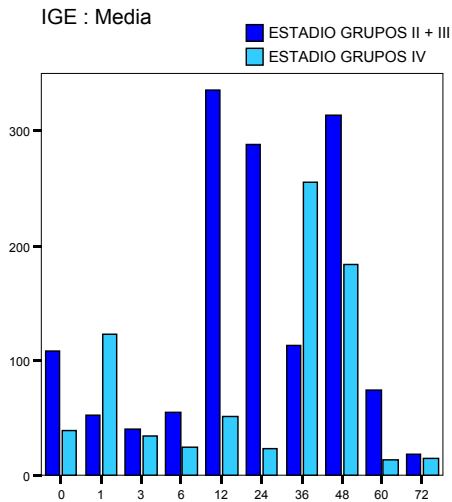
	ESTADIO GRUPOS	
	II + III	IV
0	199,92	170,38
1*	180,27	136,80
3*	152,80	105,83
6*	161,24	104,51
12	165,54	138,29
24	180,62	122,38
36	176,77	143,67
48	177,18	89,78
60	166,26	137,43
72	127,27	128,82

* En los meses +1,+3 y +6 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la concentración de Inmunoglobulina A entre los dos subgrupos.

INMUNOGLOBULINA M.

	ESTADIO GRUPOS	
	II + III	IV
0	96,43	90,13
1	71,47	63,95
3	83,20	70,49
6	83,00	79,29
12	76,90	70,04
24	80,88	73,88
36	87,76	82,26
48	112,29	63,55
60	95,76	100,47
72	108,53	87,25

* No se ha encontrado en ningún mes diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la concentración de Inmunoglobulinas M entre los dos subgrupos.

INMUNOGLOBULINA E.

	ESTADIO GRUPOS	
	II + III	IV
0	108,43	39,40
1	53,30	122,85
3	40,02	34,14
6	55,57	24,49
12	336,07	51,28
24*	288,31	23,09
36	113,42	255,42
48	314,10	183,37
60	75,18	13,60
72	18,70	14,65

* En el mes + 24 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la concentración de Inmunoglobulina E entre los dos subgrupos.

RESUMEN DE LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENCONTRADAS EN LOS PARAMETROS INMUNOLÓGICOS ENTRE LAS PACIENTES CON ESTADIO LOCALIZADO Y LAS PACIENTES CON ENFERMEDAD METASTÁSICA.

MESES	0	+1	+3	+6	+12	+24	+36	+48	+60	+72
Linfocitos totales	-	-	↑	↑	-	-	-	↓	-	-
Linf.T(CD3 mm3)	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-
Linf. T (CD3 %)	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-
Linf. CD4 mm3	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-
Linf. CD4 %	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-
Linf CD8 mm3	-	↓	↑	↑	-	-	-	-	-	-
Linf. CD8 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD4/CD8	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-
Linf B mm3	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-
Linf. B %	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-
Linf. NK mm3	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-
Linf NK %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ig G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ig A	-	↓	↓	↓	-	-	-	-	-	-
Ig M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ig E	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-

↑ Parámetro aumentado de forma estadísticamente significativa en pacientes estadio IV en relación a pacientes estadio II-III.

↓ Parámetro disminuido de forma estadísticamente significativa en pacientes estadio IV en relación a pacientes estadio II-III.

En el gráfico anterior se observa como en el mes +1 tras el transplante las pacientes estadio IV presentan una disminución estadísticamente significativa tanto en el número de Linfocitos CD8/mm³, como en la concentración de Inmunoglobulina A respecto a las pacientes en estadio II-III. Esta disminución en la concentración de Inmunoglobulina A persiste hasta el sexto mes tras el transplante.

Entre el tercer y sexto mes de recuperación postransplante existe un aumento estadísticamente significativo (en las pacientes estadio IV) de los siguientes parámetros inmunológicos: Linfocitos totales, Linfocitos CD3/mm³, Linfocitos CD4/mm³, Linfocitos CD8/mm³ y Linfocitos NK/mm³.

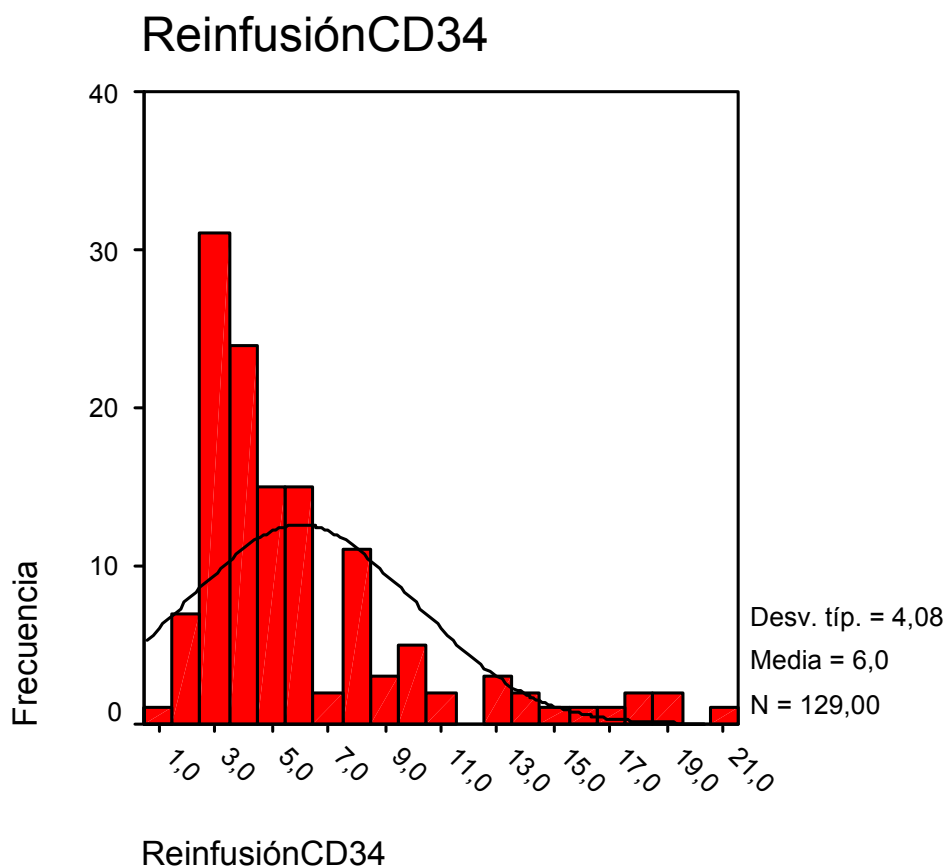
Al año del transplante no existen diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros inmunológicos estudiados, entre los dos grupos de pacientes, apareciendo a los dos años y de forma aislada un aumento en el porcentaje de Linfocitos CD4 y en el cociente CD4/CD8 estadísticamente significativo en pacientes en estadio IV, con una disminución significativa de los Linfocitos B y de la concentración de Inmunoglobulina E en dicho grupo.

Posteriormente se observa una disminución de los Linfocitos Totales en las pacientes estadio IV 48 meses tras el transplante y un aumento aislado del porcentaje de Linfocitos CD3 respecto al total de Linfocitos en el 5^o año postransplante.

2.2.2 EVOLUCION POR NUMERO DE CD34 REINFUNDIDAS

ASPECTOS GENERALES DE LA REINFUSION DE CD34

La muestra a estudio está constituida por 129 pacientes con una media de reinfusión de CD34 de $6,021 \times 10^6$ cel/Kg., una desviación estándar de 4,0789 y una mediana de $4,600 \times 10^6$ (rango 1,4 – 20,5).



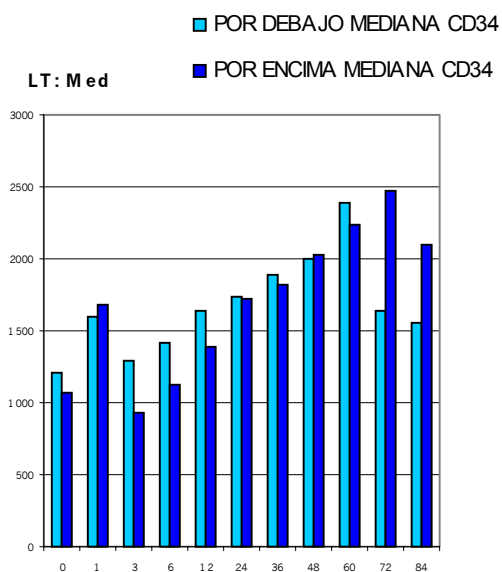
Si dividimos la muestra en dos subgrupos según el estadio y comparamos la media de células CD34 reinfundidas en cada uno de los dos subgrupos observamos que la diferencia que existe no es estadísticamente significativa ($p = 0,300$).

	ESTADIO	II+III- IV	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Reinfusión CD34	II+III		84	6,294	3,9773	,4340
	IV		45	5,511	4,2602	,6351

EVOLUCION POR SUBGRUPOS

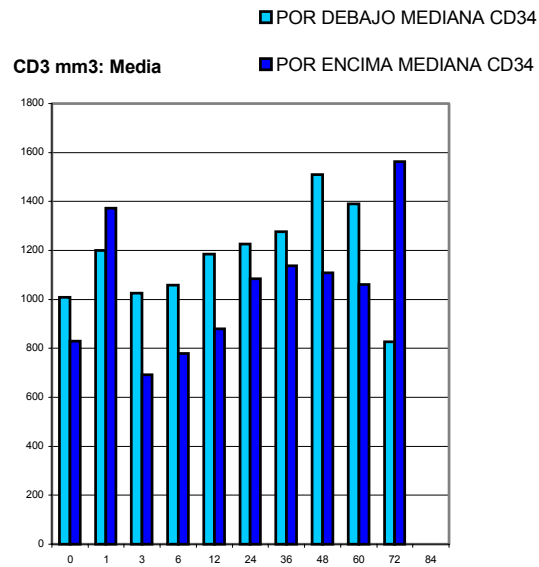
Se ha dividido cada uno de los parámetros inmunológicos de las pacientes en dos subgrupos en dependencia del número de CD34 reinfundidas (pacientes con reinfusión de CD34 por encima de la mediana vs pacientes con reinfusión de CD34 por debajo de la mediana) y se ha comparado la media de cada valor en cada momento del tiempo entre los dos subgrupos.

LINFOCITOS TOTALES



Linfocitos Totales		
MESES	GRUPOS DE PACIENTES (MEDIAS)	
	POR DEBAJO MEDIANA CD34	POR ENCIMA MEDIANA CD34
0	1207	1067
1	1598	1683
3	1288	929
6	1416	1123
12	1644	1389
24	1738	1716
36	1891	1818
48	1994	2031
60	2392	2230
72	1645	2470
84	1560	2093

* En el mes +3 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el número total de Linfocitos entre los dos subgrupos.

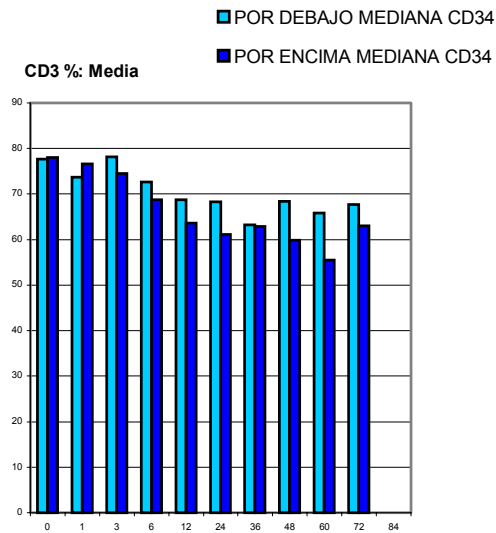
LINFOCITOS T (CD3/mm3)

CD3mm3

MESES	GRUPOS DE PACIENTES (MEDIAS)	
	POR DEBAJO MEDIANA CD34	POR ENCIMA MEDIANA CD34
	0	1007
1	1199	1371
3	1024	691
6	1058	778
12	1185	880
24	1225	1085
36	1277	1135
48	1509	1108
60	1390	1061
72	827	1562

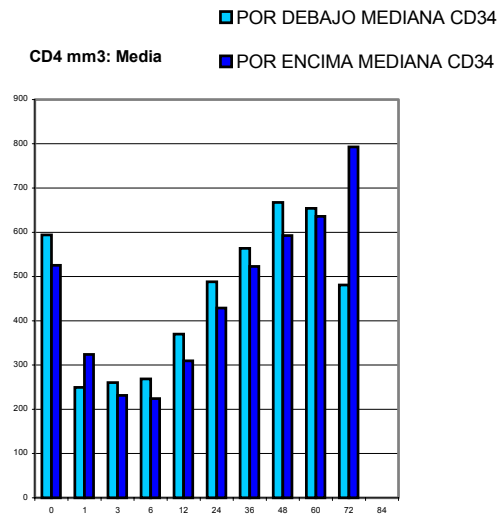
* En los meses +3,+6,+12 y +72 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el número total de Linfocitos CD3 entre los dos subgrupos.

LINFOCITOS T (% CD3)



MESES	GRUPOS DE PACIENTES (MEDIAS)	
	POR DEBAJO MEDIANA CD34	POR ENCIMA MEDIANA CD34
	0	77
1	73	76
3	78	74
6	72	68
12	68	63
24	68	61
36	63	62
48	68	59
60	65	55
72	67	63

* En el mes + 24 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el porcentaje de Linfocitos CD3 entre los dos subgrupos.

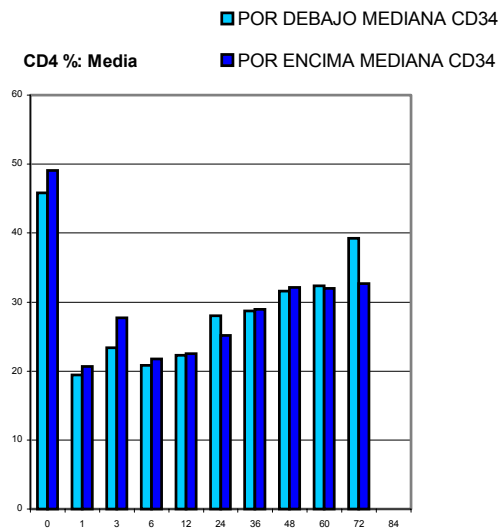
LINFOCITOS CD4 (mm3)

CD4mm3

MESES	GRUPOS DE PACIENTES (MEDIAS)	
	POR DEBAJO MEDIANA CD34	POR ENCIMA MEDIANA CD34
0	593	525
1	249	323
3	260	230
6	268	224
12	369	309
24	487	429
36	563	523
48	667	593
60	654	636
72	481	792

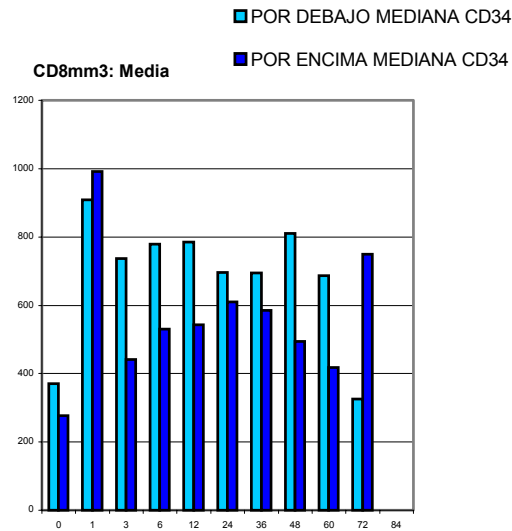
* En los meses +1y +72 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el número total de Linfocitos CD4 entre los dos subgrupos.

LINFOCITOS CD4 (%)



CD4%		
MESES	GRUPOS DE PACIENTES (MEDIAS)	
	POR DEBAJO MEDIANA CD34	POR ENCIMA MEDIANA CD34
0	45	49
1	19	20
3	23	27
6	20	21
12	22	22
24	28	25
36	28	28
48	31	32
60	32	32
72	39	32

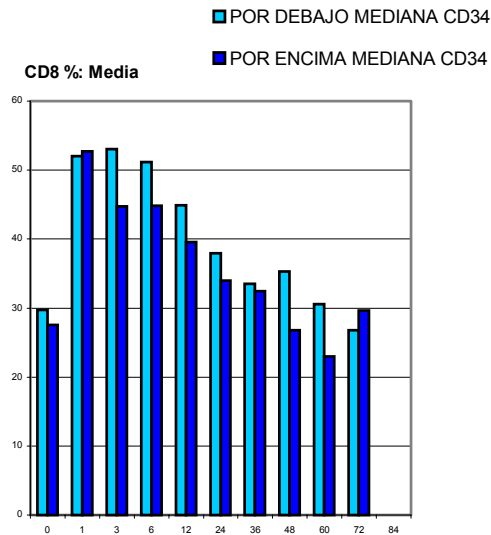
* No se ha encontrado en ningún mes diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el porcentaje de Linfocitos CD4 entre los dos subgrupos.

LINFOCITOS CD8 (mm3)CD8
mm3

MESES	GRUPOS DE PACIENTES (MEDIAS)	
	POR DEBAJO MEDIANA CD34	POR ENCIMA MEDIANA CD34
0	371	276
1	908	992
3	736	441
6	779	530
12	785	543
24	695	610
36	695	585
48	809	494
60	686	417
72	325	749

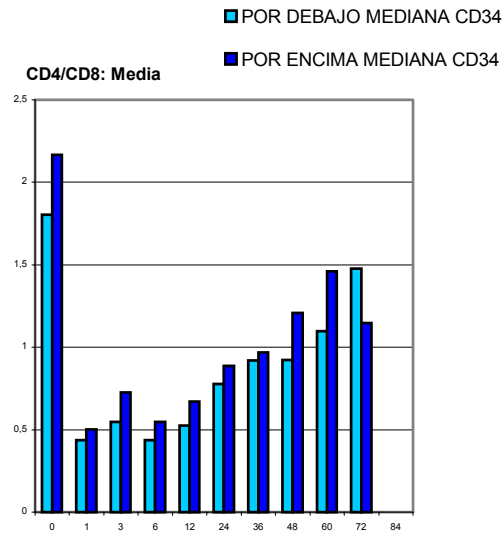
* En los meses +3, +6, +12 y + 72 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el porcentaje de Linfocitos CD8 entre los dos subgrupos.

LINFOCITOS CD8 (%)



MESES	GRUPOS DE PACIENTES (MEDIAS)	
	POR DEBAJO MEDIANA CD34	POR ENCIMA MEDIANA CD34
	0	29
1	52	52
3	53	44
6	51	44
12	44	39
24	37	33
36	33	32
48	35	26
60	30	23
72	26	29

* En los meses +3, +6 y +48 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el porcentaje de Linfocitos CD8 entre los dos subgrupos.

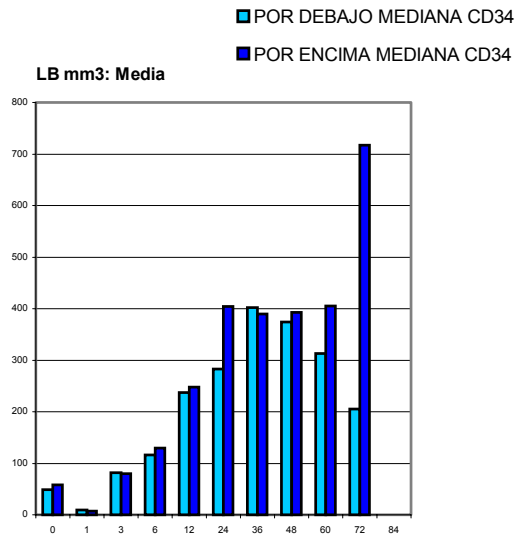
COCIENTE LINFOCITOS CD4/CD8.

CD4/CD8

MESES	GRUPOS DE PACIENTES (MEDIAS)	
	POR DEBAJO MEDIANA CD34	POR ENCIMA MEDIANA CD34
	0	1,8024
1	0,4383	0,5005
3	0,5459	0,7262
6	0,438	0,548
12	0,5251	0,6689
24	0,7762	0,8873
36	0,9195	0,9667
48	0,9224	1,2072
60	1,097	1,4615
72	1,4752	1,1472

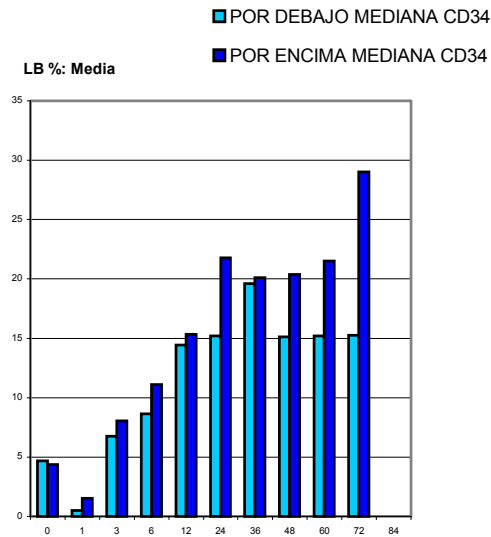
* En los meses + 3 y + 48 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el cociente CD4/CD8 entre los dos subgrupos.

LINFOCITOS B (mm3).



MESES	GRUPOS DE PACIENTES (MEDIAS)	
	POR DEBAJO MEDIANA CD34	POR ENCIMA MEDIANA CD34
0	48	57
1	9	7
3	82	80
6	115	129
12	237	247
24	283	403
36	401	389
48	373	392
60	313	405
72	204	716

* En los meses + 24 y +72 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el número de Linfocitos B entre los dos subgrupos.

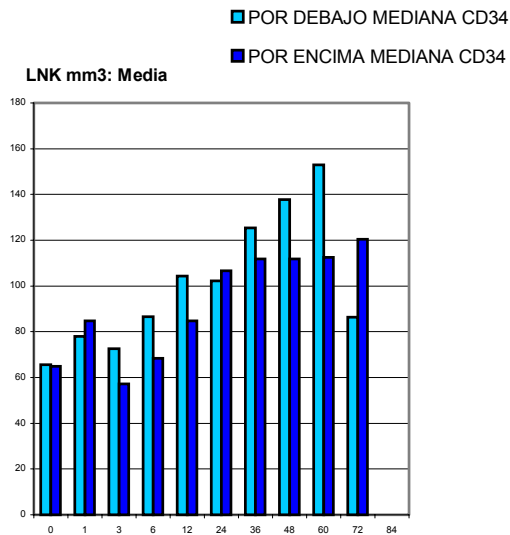
LINFOCITOS B (%).

LB%

MESES	GRUPOS DE PACIENTES (MEDIAS)	
	POR DEBAJO MEDIANA CD34	POR ENCIMA MEDIANA CD34
0	4,6	4,3
1	0,5	1,5
3	6,7	8,06
6	8,6	11,09
12	14,4	15,3
24	15,2	21,7
36	19,6	20,08
48	15,1	20,3
60	15,2	21,5
72	15,2	29

* En los meses + 24 y +72 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el porcentaje de Linfocitos B entre los dos subgrupos.

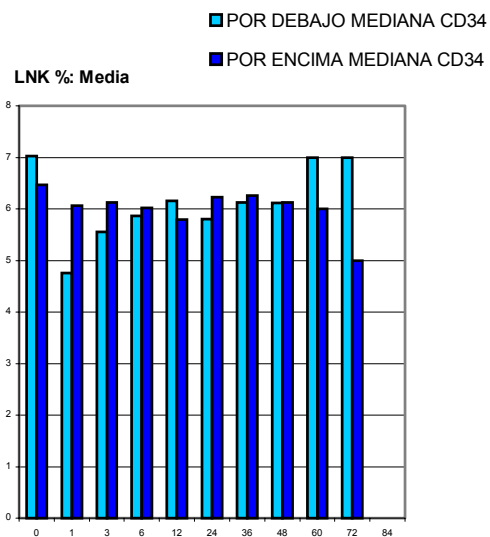
LINFOCITOS NK (mm3).



LNK

MESES	GRUPOS DE PACIENTES (MEDIAS)	
	POR DEBAJO MEDIANA CD34	POR ENCIMA MEDIANA CD34
0	65	64
1	78	84
3	72	57
6	86	68
12	104	84
24	102	106
36	125	111
48	137	111
60	152	112
72	86	120

* En los meses +1,+3 y +12 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el número total de Linfocitos NK entre los dos subgrupos.

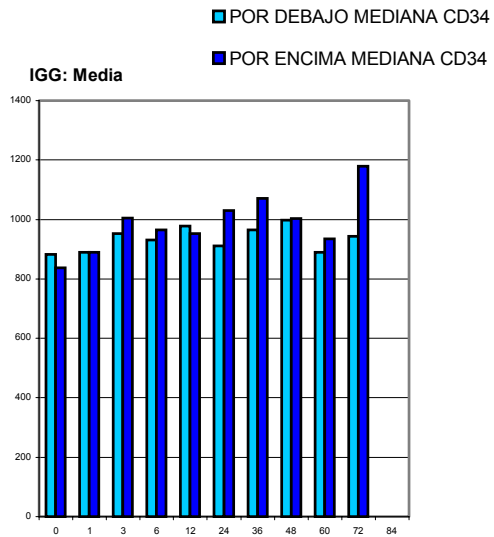
LINFOCITOS NK (%).

LNK%

MESES	GRUPOS DE PACIENTES (MEDIAS)	
	POR DEBAJO MEDIANA CD34	POR ENCIMA MEDIANA CD34
0	7,02	6,4
1	4,7	6,06
3	5,5	6,1
6	5,8	6,01
12	6,1	5,7
24	5,8	6,2
36	6,1	6,2
48	6,1	6,1
60	7	6
72	7	5

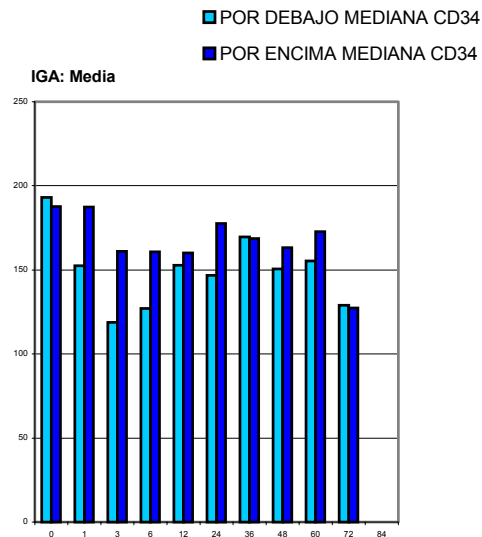
* En los meses +3 y +72 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el porcentaje de Linfocitos NK entre los dos subgrupos.

INMUNOGLOBULINA G.



MESES	GRUPOS DE PACIENTES (MEDIAS)	
	POR DEBAJO MEDIANA CD34	POR ENCIMA MEDIANA CD34
0	882	838
1	889	889
3	952	1005
6	931	965
12	977	953
24	910	1029
36	965	1070
48	997	1002
60	890	935
72	942	1179

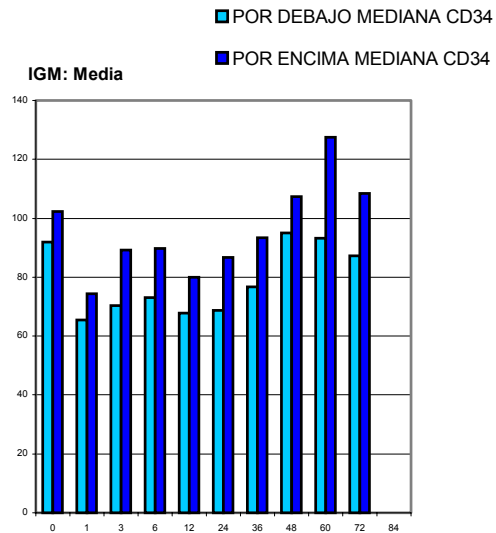
* No se ha encontrado en ningún mes diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la concentración de Inmunoglobulina G entre los dos subgrupos.

INMUNOGLOBULINA A.

MESES	GRUPOS DE PACIENTES (MEDIAS)	
	POR DEBAJO MEDIANA CD34	POR ENCIMA MEDIANA CD34
	0	193
1	152	187
3	118	161
6	127	160
12	152	160
24	146	177
36	169	168
48	150	163
60	155	172
72	128	127

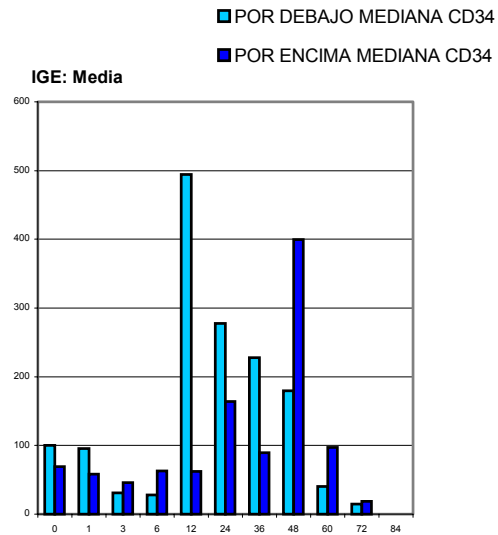
* En el mes +3 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la concentración de Inmunoglobulina A entre los dos subgrupos.

INMUNOGLOBULINA M.



MESES	GRUPOS DE PACIENTES (MEDIAS)	
	POR DEBAJO MEDIANA CD34	POR ENCIMA MEDIANA CD34
	0	91,9
1	65,3	74,2
3	70,3	89,2
6	73,07	89,6
12	67,8	79,9
24	68,7	86,7
36	76,6	93,3
48	95,06	107,3
60	93,2	127,5
72	87,2	108,5

* En los meses +3 y +6 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la concentración de Inmunoglobulina M entre los dos subgrupos.

INMUNOGLOBULINA E.

MESES	IGe	
	GRUPOS DE	
	PACIENTES (MEDIAS)	
	POR DEBAJO MEDIANA CD34	POR ENCIMA MEDIANA CD34
0	100,2	69,4
1	95,3	58,2
3	31,05	45,9
6	27,7	62,7
12	494,4	61,9
24	277,5	163,9
36	228,02	89,2
48	179,7	399,4
60	40,7	96,8
72	14,6	18,7

* No se ha encontrado en ningún mes diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la concentración de Inmunoglobulina E entre los dos subgrupos.

RESUMEN DE LAS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENCONTRADAS EN LOS PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS ENTRE LAS PACIENTES QUE SE REINFUNDIO UN NUMERO DE CD34 POR ENCIMA DE LA MEDIANA Y LAS PACIENTES CON CD34 POR DEBAJO DE LA MEDIANA.

MESES	0	+1	+3	+6	+12	+24	+36	+48	+60	+72
Linfocitos totales	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-
Linf.T(CD3 mm3)	-	-	↓	↓	↓	-	-	-	-	↑
Linf. T (CD3 %)	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-
Linf. CD4 mm3	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	↑
Linf. CD4 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linf CD8 mm3	-	-	↓	↓	↓	-	-	-	-	↑
Linf. CD8 %	-	-	↓	↓	-	-	-	↓	-	-
CD4/CD8	-	-	↑	-	-	-	-	↑	-	-
Linf B mm3	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	↑
Linf. B %	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	↑
Linf. NK mm3	-	↑	↓	-	↓	-	-	-	-	-
Linf NK %	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	↑
Ig G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ig A	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-
Ig M	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-
Ig E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

↑ Parámetro aumentado de forma estadísticamente significativa en pacientes con reinfusión de CD34 por encima de la mediana.

↓ Parámetro disminuido de forma estadísticamente significativa en pacientes con reinfusión de CD34 por encima de la mediana.

En el gráfico anterior observamos que las pacientes con número de CD34 por encima de la mediana presentan a corto plazo (mes +1) un mayor número de Linfocitos CD4/mm³ y Linfocitos NK/mm³, respecto a las pacientes con un número de CD34 por debajo de la mediana de forma estadísticamente significativa.

A medio plazo (meses +3 a +24) observamos en el grupo de pacientes con CD34 superior un aumento estadísticamente significativo del cociente CD4/CD8 en el mes +3, del porcentaje de linfocitos NK respecto al total de Linfocitos y de la concentración de Inmunoglobulina A también en el mes +3. Un aumento sostenido en los meses +3 a +6 de la concentración de Inmunoglobulina M y de los Linfocitos B en el mes +24. Tanto los Linfocitos CD8 (en su valor absoluto y porcentual) del mes +3 al +12, los Linfocitos NK/mm³ en los meses +3 y +6, así como los Linfocitos totales en el mes +3 y los Linfocitos T del mes +3 al +12 se encuentran disminuidos de manera estadísticamente significativa en las pacientes con mayor número de CD34.

A largo plazo (meses +36 a +72) a pesar del limitado número de pacientes, se observan diferencias estadísticamente significativas en el mes +48 siendo más alto el cociente CD4/CD8 en las pacientes con mayor número de CD34 y más bajo de manera también significativa el porcentaje de células CD8 en dicho subgrupo. En el mes +72 se observa un aumento de los Linfocitos CD3, Linfocitos CD4, Linfocitos CD8, Linfocitos B (en su valor absoluto y porcentual) y del porcentaje de Linfocitos NK en el grupo de pacientes con CD34 por encima de la mediana.

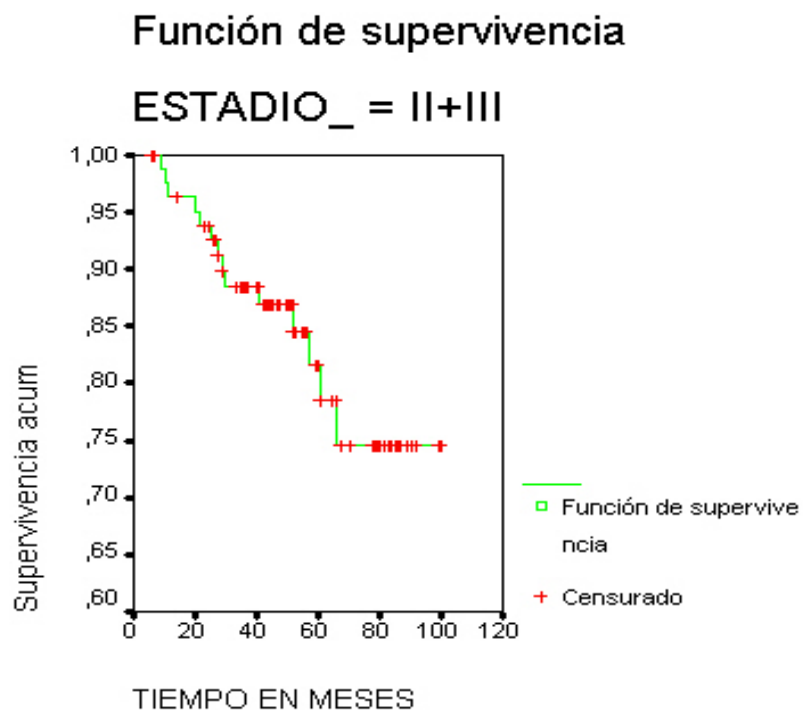
3. RELACION ENTRE LOS PARAMETROS INMUNOLOGICOS Y LA EVOLUCION DE LAS PACIENTES

3.1. SUPERVIVENCIA GLOBAL.

Después de haber dividido la muestra en subgrupos, se ha analizado la supervivencia de cada uno ellos.

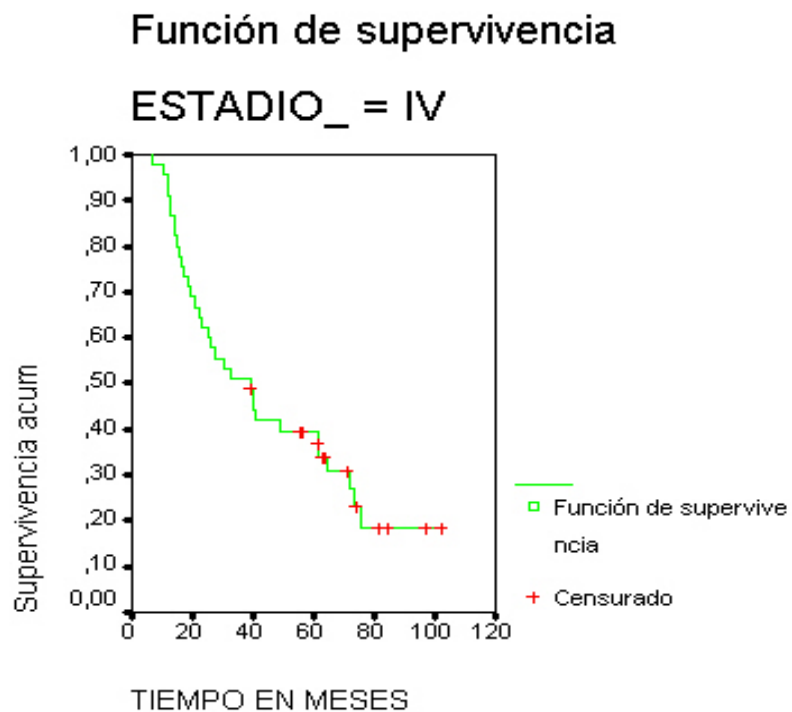
A) EN FUNCIÓN DEL ESTADIO ($p = 0,001$):

Gráfico 1: Supervivencia global de las pacientes estadio II-III.



- Media de supervivencia global en las pacientes estadio II-III: 85 meses.
Mediana no alcanzado con más del 75 % de las pacientes vivas a los 5 años de seguimiento.

Gráfico 2: Supervivencia global de las pacientes estadio IV:

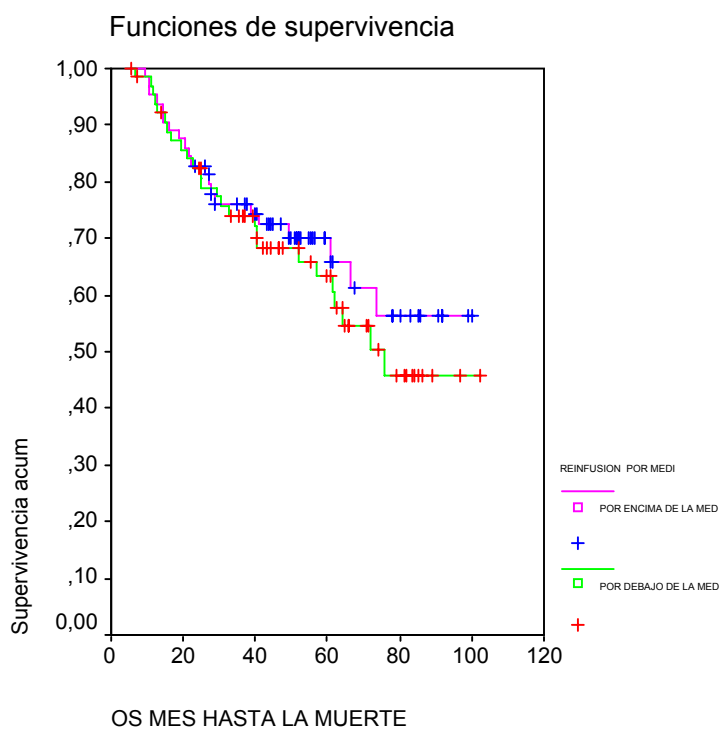


- Media de supervivencia global en las pacientes estadio IV: 47 meses.
Mediana: 39 meses.

B) EN FUNCION DEL NUMERO DE CD34 REINFUNDIDAS:

Se ha comparado la supervivencia global entre las pacientes con reinfusión de CD34 por encima de la mediana ($4,6 \times 10^6$ cel /Kg.) y aquellas por debajo de la mediana, así se ha dividido a las pacientes según el número de células CD34 reinfundidas y se ha buscado si existen diferencias estadísticamente significativas entre la supervivencia global de los dos grupos no encontrando dicha diferencia de manera significativa ($p=0,51$).

Gráfico 3: Supervivencia de las pacientes en función del número de CD34.



P= 0,51

* Media de supervivencia global en pacientes con reinfusión de CD34 por encima de la mediana: 72 meses.

* Media de supervivencia global en pacientes con reinfusión de CD34 por debajo de la mediana: 69 meses. Mediana: 76 meses.

C) EN FUNCION DE LOS PARAMETROS INMUNOLOGICOS EN EL MES +1 Y +3.

Se ha buscado si podría existir relación entre algún parámetro inmunológico en los meses +1 y +3 postransplante y la supervivencia global de las pacientes. Para realizar la comparación se ha calculado la mediana de cada uno de los parámetros inmunológicos en esos dos momentos del tiempo y se ha dividido a las pacientes en aquellas con valores por encima y por debajo de la mediana de dichos parámetros en dichos meses calculándose si existían diferencias significativas ($p < 0,05$) en la supervivencia global y por lo tanto relación entre algunos de los parámetros y la supervivencia.

Tabla 1: Niveles de significación. Método de Log-Rank test.

MESES	+1	+3
Linfocitos totales	0,34	0,63
Linf.T(CD3 mm3)	0,18	0,38
Linf. T (CD3 %)	0,60	0,74
Linf. CD4 mm3	0,10	0,29
Linf. CD4 %	0,53	0,00
Linf CD8 mm3	0,21	0,40
Linf. CD8 %	0,05	0,02
CD4/CD8	0,35	0,16
Linf B mm3	0,09	0,39
Linf. B %	0,11	0,80
Linf. NK mm3	0,04	0,54
Linf NK %	0,97	0,13
Ig G	0,62	0,88
Ig A	0,85	0,90
Ig M	0,96	0,91
Ig E	0,63	0,33

*Según los resultados expresados en la tabla anterior, las pacientes con un porcentaje de CD8 por encima de la mediana en el mes +1 y con un número de Linfocitos NK también por encima de la mediana, presentan una supervivencia global mayor con una diferencia estadísticamente significativa respecto a aquellas cuyas cantidades están por debajo de la mediana (Gráficos 4 y 5).

Gráfico 4: Supervivencia global de las pacientes en dependencia del porcentaje de células CD8 presentes en el mes +1 postransplante.

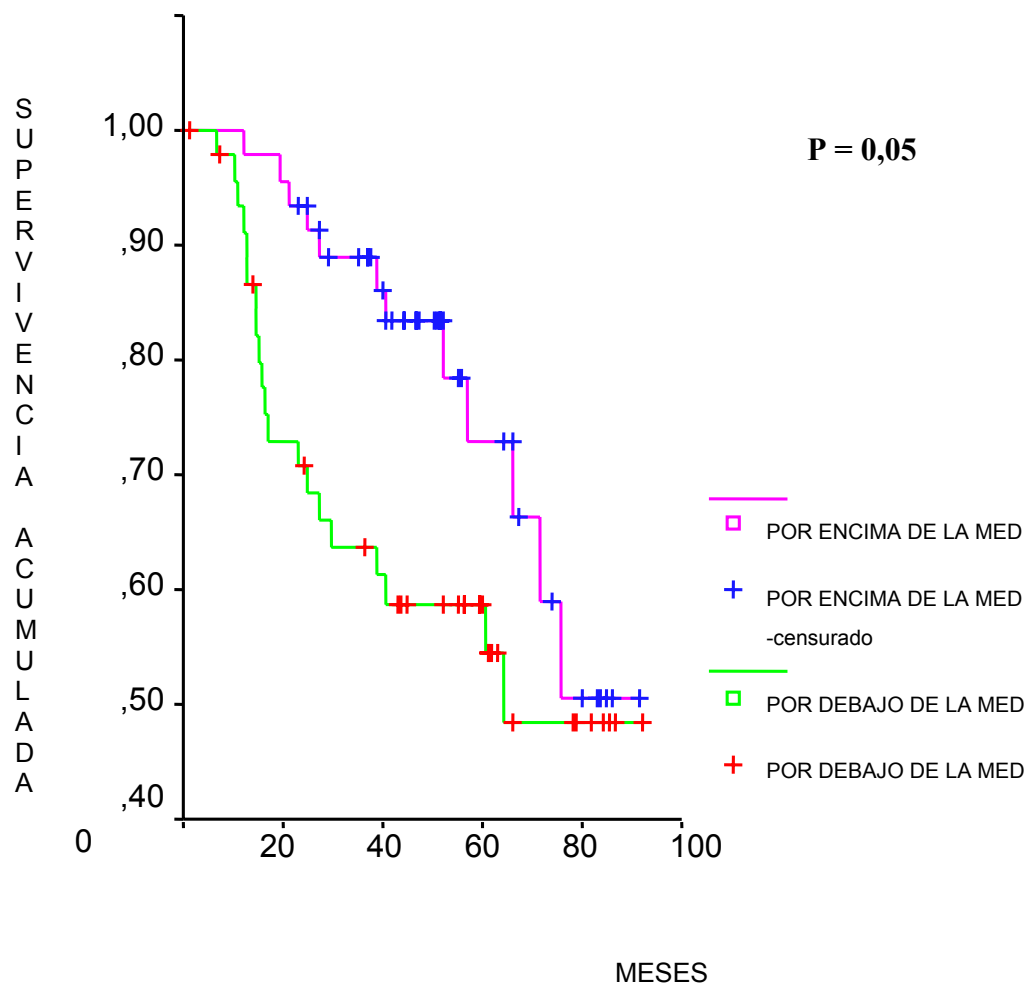
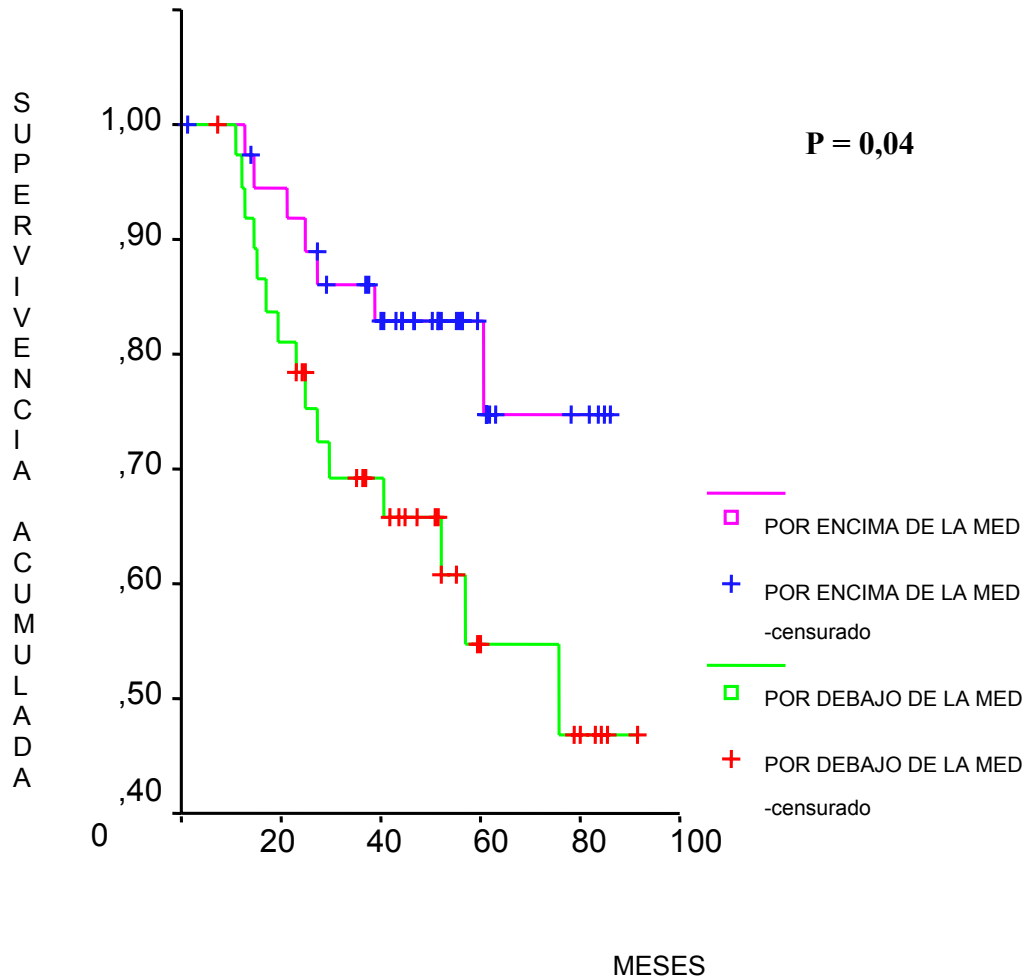


Grafico 5: Supervivencia global de las pacientes en dependencia de las células NK/mm³ presentes en el mes +1 postransplante.



* De igual manera en el mes +3 la supervivencia global es mayor con una diferencia estadísticamente significativa en las pacientes cuyo porcentaje de CD4 está por encima de la mediana en ese momento del tiempo (Gráfico 6). En cambio las pacientes cuyo porcentaje de CD8 en el mes +3 está por encima de la mediana, tienen una supervivencia global significativamente menor (Gráfico 7).

Gráfico 6: Supervivencia global de las pacientes en dependencia del porcentaje de células CD4 presentes en el mes +3 postransplante.

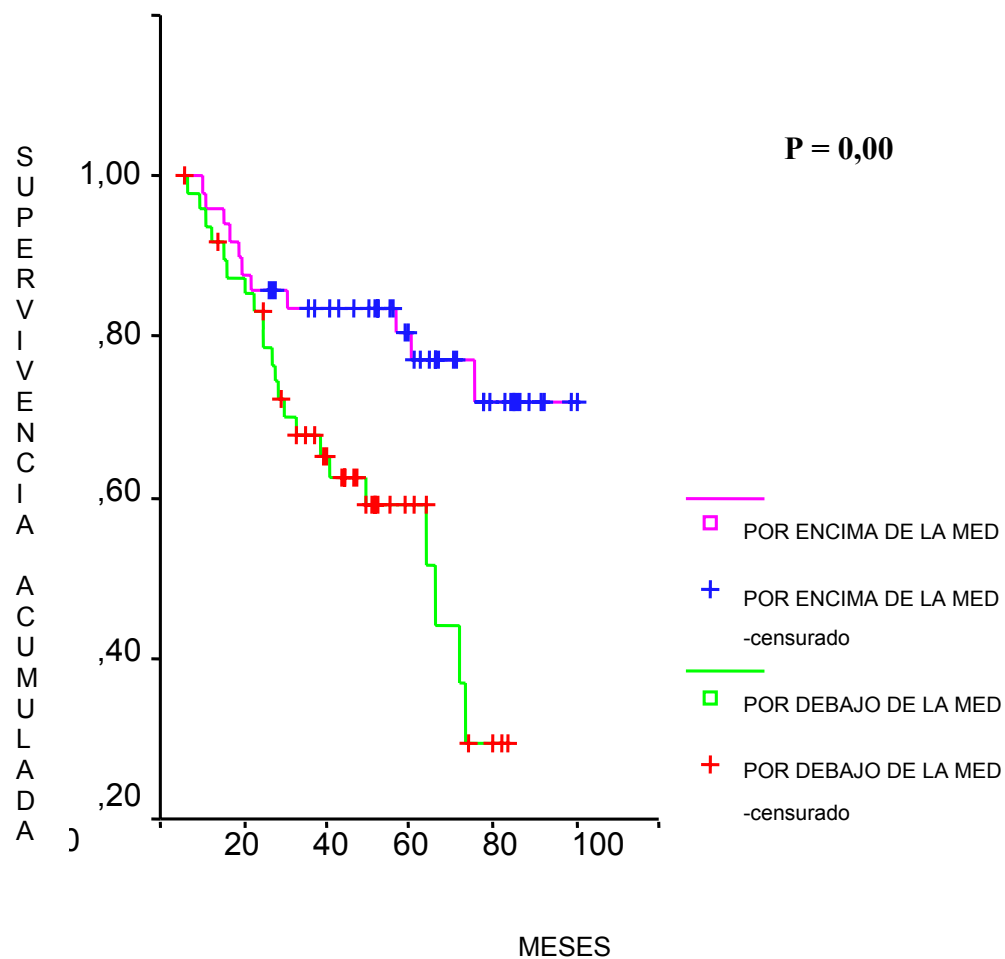
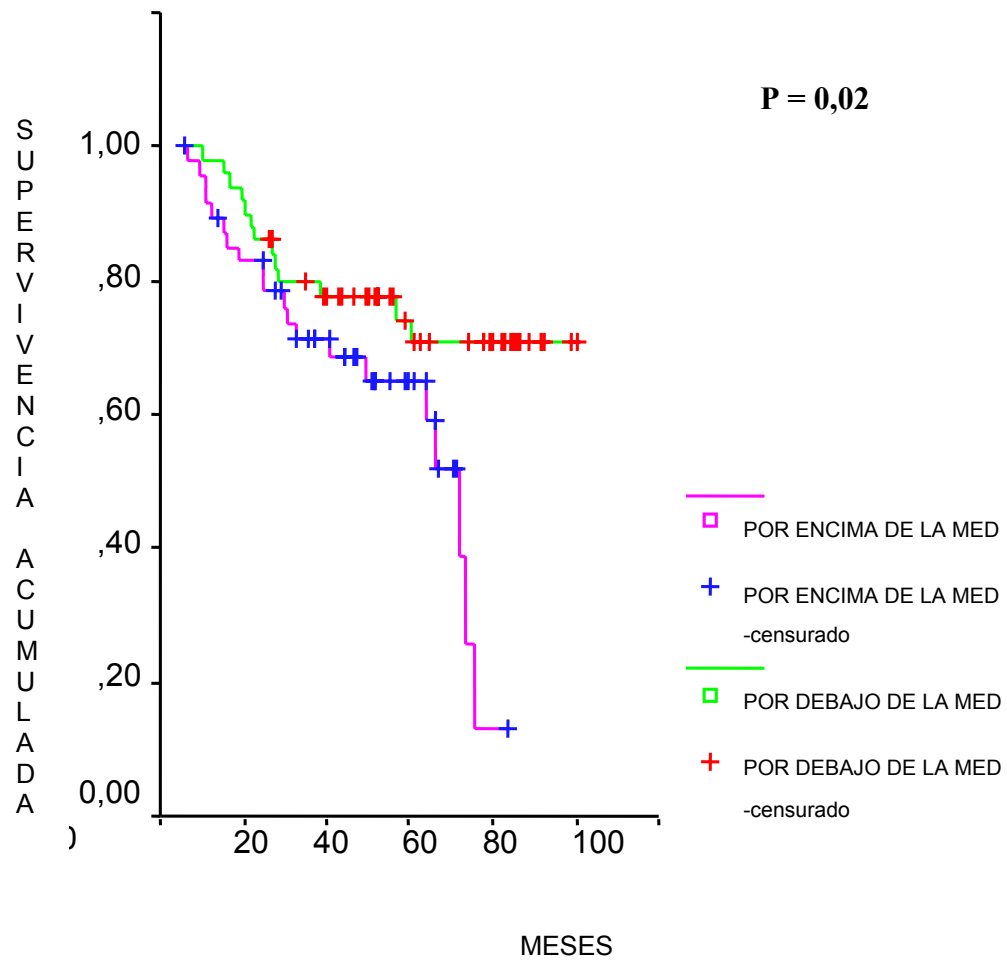


Grafico 7: Supervivencia global de las pacientes en dependencia del porcentaje de células CD8 presentes en el mes +3 postransplante.

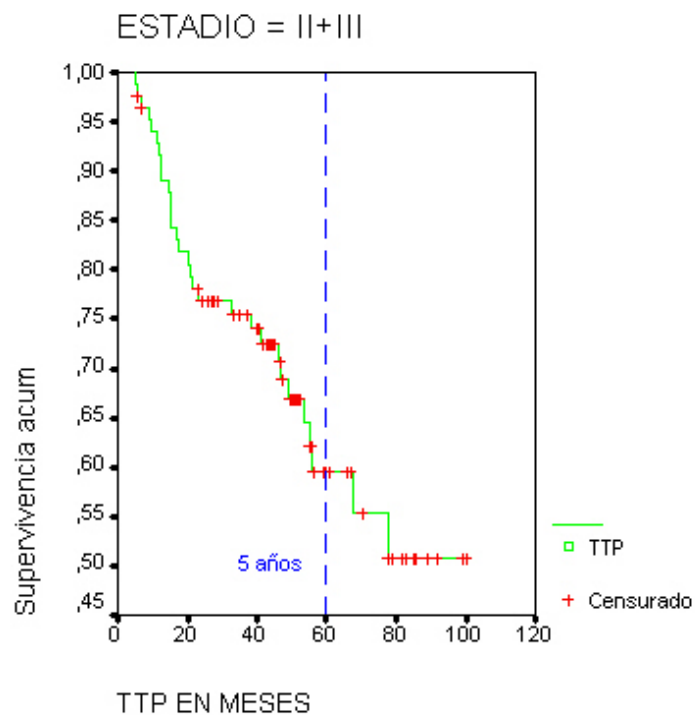


3.2. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESION

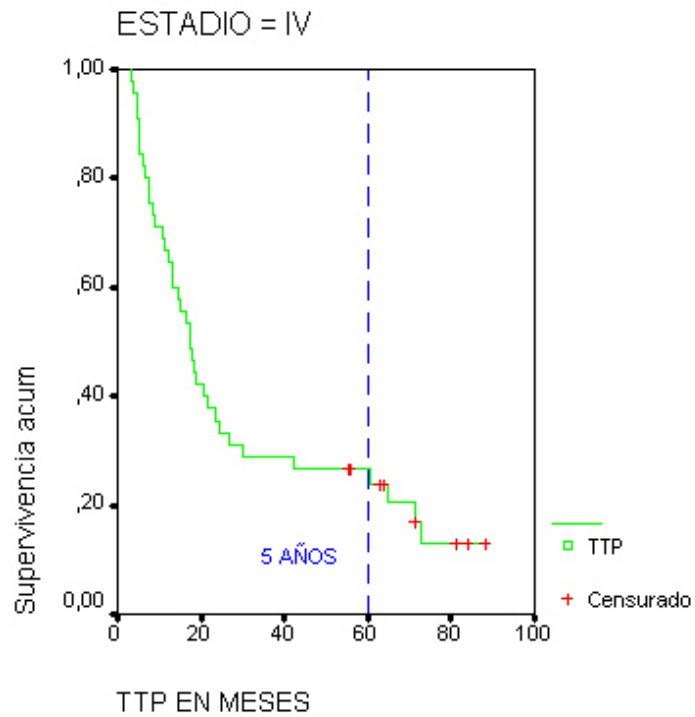
Después de haber dividido la muestra en subgrupos, se ha analizado el intervalo libre de progresión-recidiva de cada uno ellos.

A) EN FUNCION DEL ESTADIO (**P = 0,001**)

Gráfico 8: Supervivencia libre de progresión en pacientes estadio II-III.



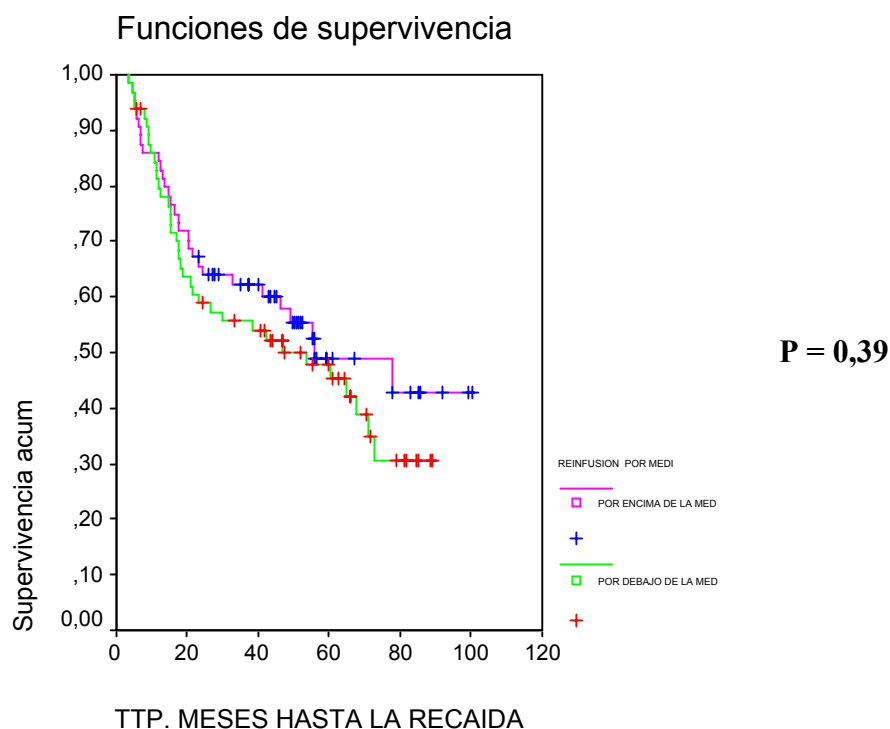
- Media de intervalo libre de recidiva en las pacientes estadio II-III: 68,72 meses. Mediana no alcanzada con más del 55% de las pacientes libres de enfermedad a los 5 años.

Gráfico 9: Supervivencia libre de progresión en pacientes estadio IV.

- Media de intervalo libre de progresión en las pacientes estadio IV: 31 meses. Mediana: 17,49 meses.

B) EN FUNCIÓN DEL NÚMERO DE CD34 REINFUNDIDAS.

Se ha comparado el intervalo libre de progresión entre las pacientes con reinfusión de CD34 por encima de la mediana ($4,6 \times 10^6$ cel/Kg.) y aquellas por debajo de la mediana, así se ha dividido a las pacientes según el número de células CD34 reinfundidas y se ha buscado si existen diferencias estadísticamente significativas en el intervalo libre de progresión entre los dos grupos, no encontrando tales diferencias.

Gráfico 10: Supervivencia libre de progresión dependiendo de número de CD34


* Media de intervalo libre de progresión-ricidiva en pacientes con reinfusión de CD34 por encima de la mediana: 59,45 meses. Mediana: 55,73 meses.

* Media de intervalo libre de progresión-ricidiva en pacientes con reinfusión de CD34 por debajo de la mediana: 48,65 meses. Mediana: 53,42 meses.

C) EN FUNCION DE LOS PARAMETROS INMUNOLOGICOS EN EL MES +1 Y +3.

Se ha buscado si podría existir relación entre algunos de los parámetros inmunológicos en los meses +1 y +3 postransplante y el intervalo libre de progresión-recidiva de las pacientes. Para realizar la comparación se ha calculado la mediana de cada uno de los parámetros inmunológicos en esos dos momentos del tiempo y se han dividido a las pacientes en aquellas con valores por encima y por debajo de la mediana en dichos meses y se ha calculado si existían diferencias significativas ($p < 0,05$) en el intervalo libre de progresión-recidiva y por lo tanto relación entre algunos de los parámetros y dicho intervalo.

Tabla 2: Niveles de significación. Método de Log-Rank test.

MESES	+1	+3
Linfocitos totales	0,21	0,76
Linf.T(CD3 mm ³)	0,13	0,96
Linf. T (CD3 %)	0,45	0,67
Linf. CD4 mm³	0,01	0,21
Linf. CD4 %	0,29	0,01
Linf CD8 mm ³	0,14	0,73
Linf. CD8 %	0,19	0,03
CD4/CD8	0,37	0,14
Linf B mm³	0,00	0,59
Linf. B %	0,01	0,71
Linf. NK mm³	0,04	0,50
Linf NK %	0,94	0,32
Ig G	0,47	0,91
Ig A	0,20	0,63
Ig M	0,26	0,37
Ig E	0,27	0,77

*En el mes +1 según los resultados expresados en la tabla anterior, las pacientes con un número de Linfocitos/mm³ CD4 y NK por encima de la mediana presentan

una supervivencia libre de progresión mayor con una diferencia estadísticamente significativa respecto a aquellas pacientes cuyos parámetros están por debajo de la mediana (Gráficos 11 y 12). En cambio las pacientes con linfocitos B por encima de la mediana en el mes +1 presentan una supervivencia libre de progresión más corta (Gráficos 13 y 14).

Gráfico 11: Supervivencia libre de progresión de las pacientes en dependencia de los linfocitos CD4/mm³ presentes en el mes +1 postransplante.

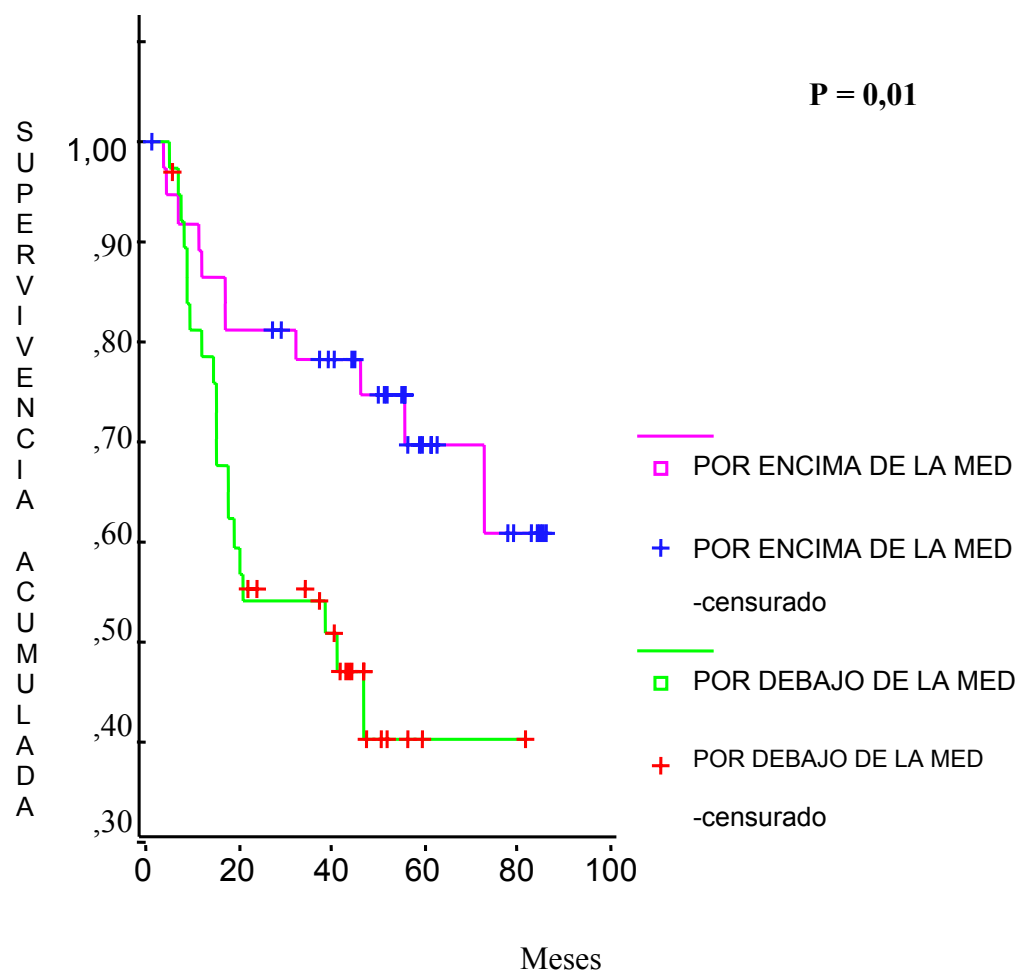


Grafico 12: Supervivencia libre de progresión de las pacientes en dependencia de los linfocitos NK/mm³ presentes en el mes +1 postransplante.

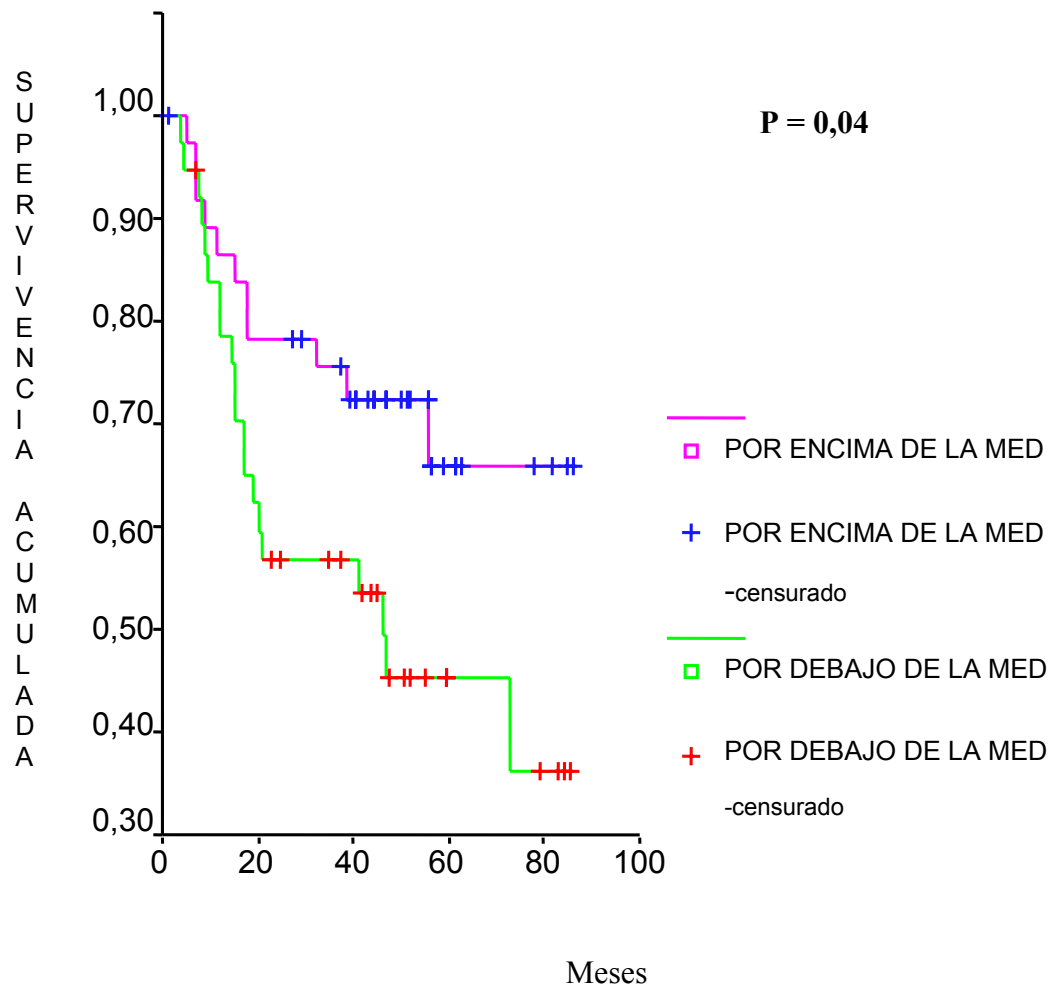


Grafico 13: Supervivencia libre de progresión de las pacientes en dependencia del porcentaje de linfocitos B presentes en el mes +1 postransplante.

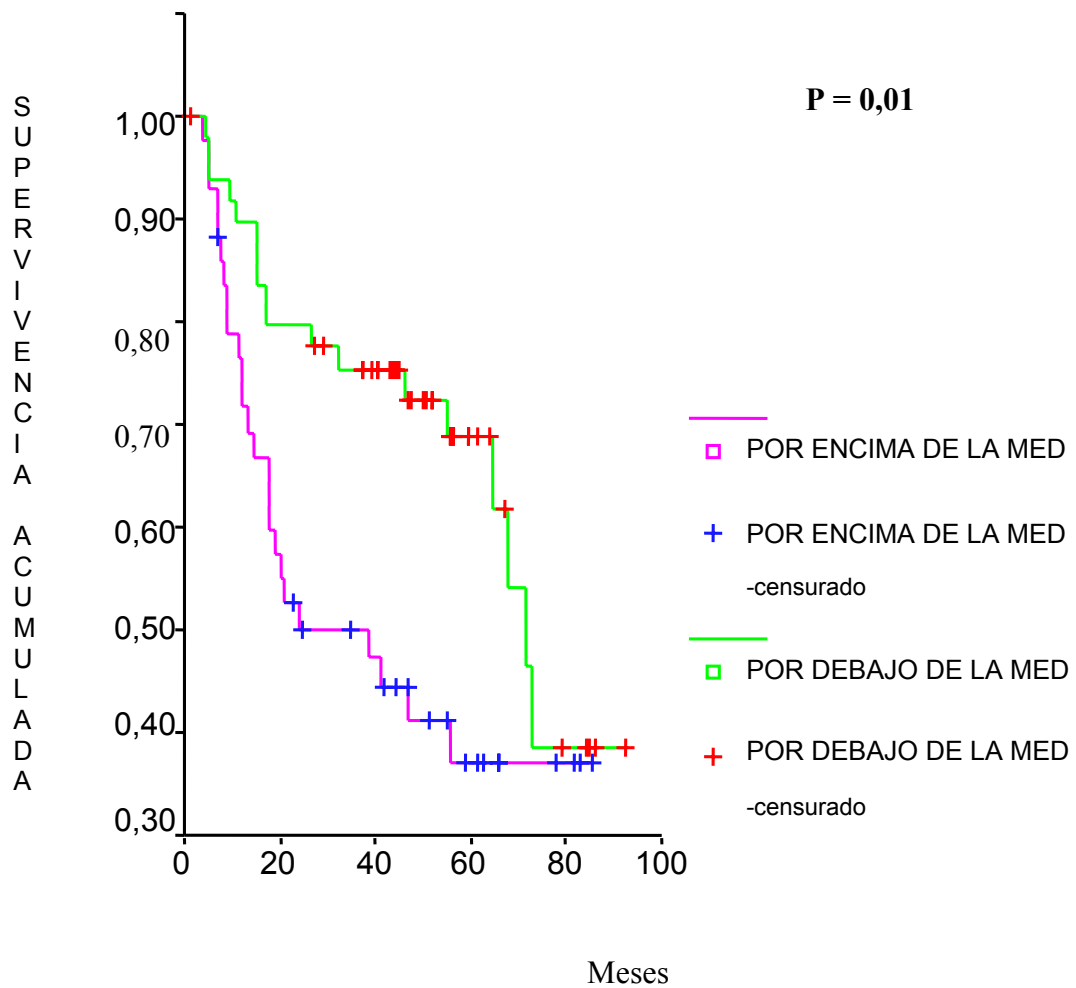
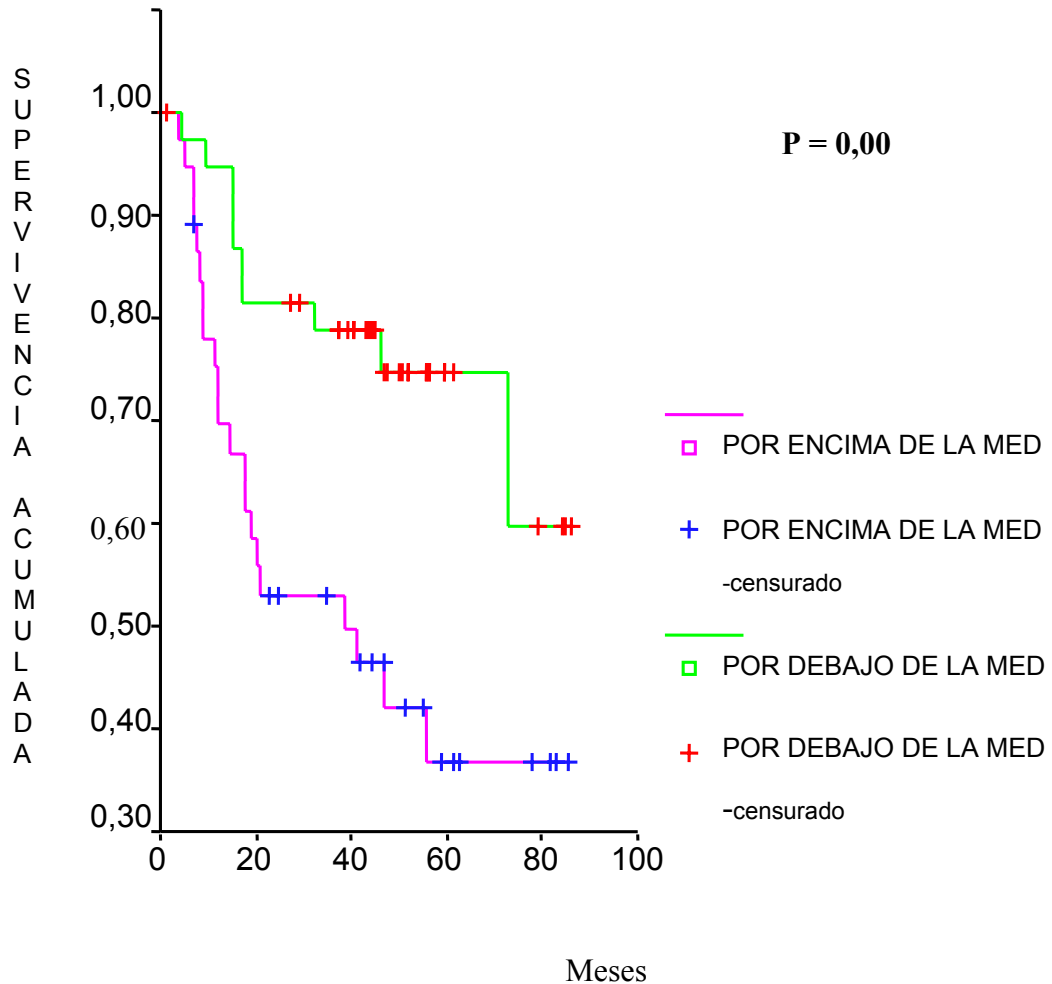


Grafico 14: Supervivencia libre de progresión de las pacientes en dependencia de los linfocitos B/mm³ presentes en el mes +1 postransplante.



* En el mes +3 el intervalo libre de progresión es mayor con una diferencia estadísticamente significativa en las pacientes cuyo porcentaje de CD4 está por encima de la mediana en ese momento del tiempo (Gráfico 15). En cambio a mayor porcentaje de linfocitos CD8 en el mes +3 postransplante menor intervalo libre de progresión (Gráfico 16).

Gráfico 15: Supervivencia libre de progresión de las pacientes en dependencia del porcentaje de linfocitos CD4 presentes en el mes +3 postransplante.

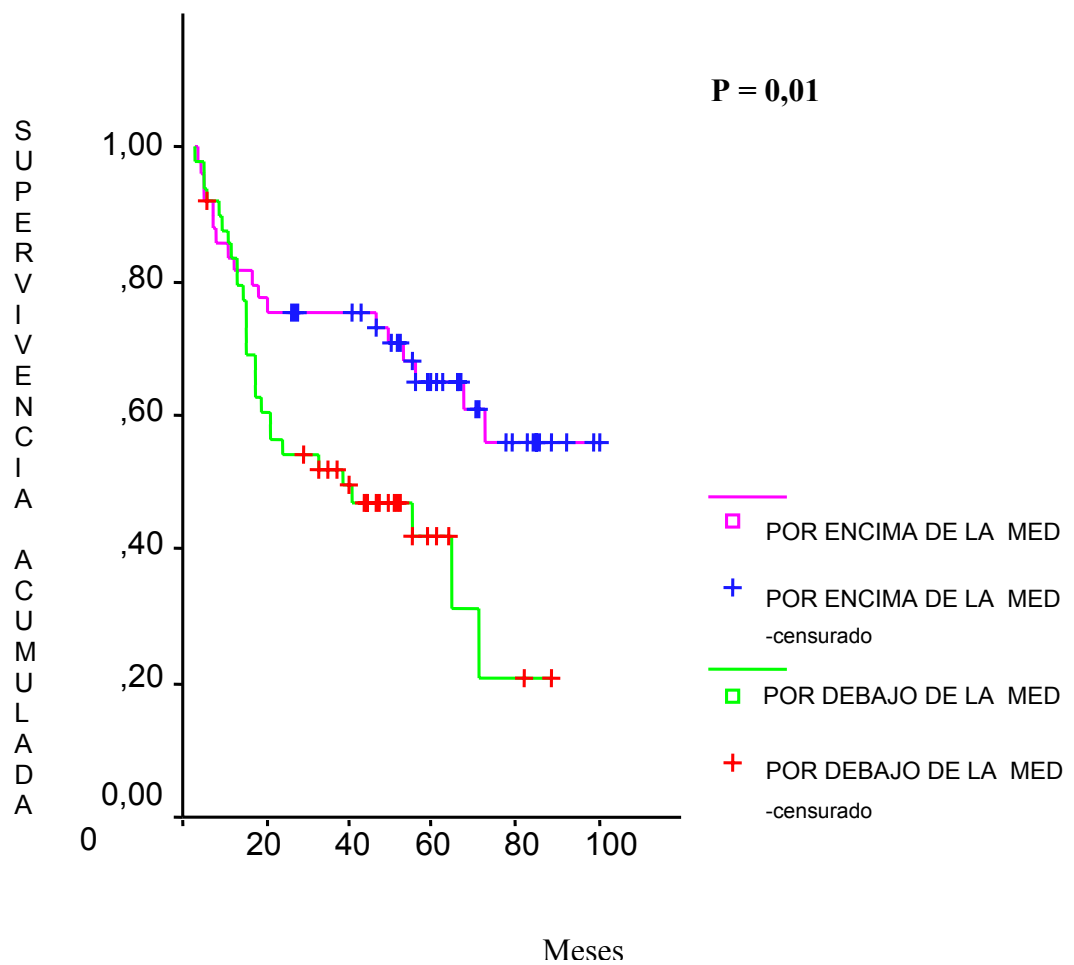
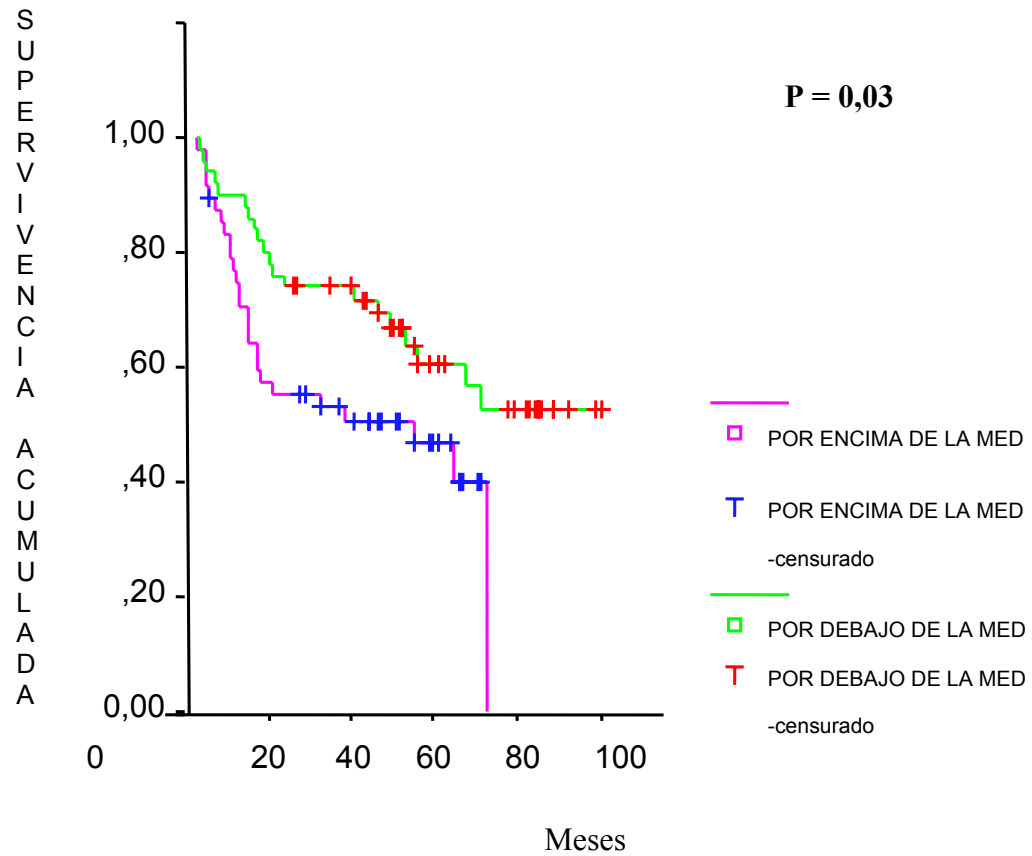


Grafico 16: Intervalo libre de progresión de las pacientes en dependencia del porcentaje de linfocitos CD8 presentes en el mes +3 postransplante.



4. ANALISIS MULTIVARIANTE.

Tras los hallazgos anteriores se ha realizado un análisis multivariante con p de una y dos colas (puesto que ciertos parámetros predicen aumento de supervivencia y otros disminución, legítimamente hemos realizado un análisis multivariante con p de una cola) teniendo en cuenta parámetros inmunológicos y clínicos que vamos a pasar a exponer tanto para la supervivencia global como para el intervalo libre de progresión en los meses +1 y +3 postransplante.

Tabla 1. Análisis multivariante para la supervivencia global, los parámetros inmunológicos son los determinados en el mes +1 postransplante.

	Sig.(1)	Sig.(2)	RR	95,0 % IC	
				Inferior	Superior
ESTADIO	,000	,001	,105	,029	,379
CD4/ 8	,045	,091	,000	,000	4,474
IGM	,094	,188	1,013	,994	1,033
LNK %	,142	,284	,771	,479	1,241
LNK mm3	,206	,413	1,009	,988	1,031
CD4 mm3	,252	,504	,986	,946	1,028
CD4%	,263	,526	1,239	,639	2,403
LB mm3	,268	,536	1,061	,880	1,278
CD8%	,272	,545	,830	,454	1,518
LB %	,338	,677	,563	,038	8,394
CD3%	,350	,701	1,111	,650	1,897
IGG	,355	,710	1,001	,998	1,003
CD34	,367	,734	,976	,849	1,123
IGE	,385	,770	1,001	,996	1,006
CD8 mm3	,407	,814	,996	,961	1,032
E. MENOPAUSICO	,412	,825	,845	,189	3,776
IGA	,417	,834	,999	,989	1,009
CD3 mm3	,427	,855	1,003	,972	1,035
LINF. TOTALES	,464	,929	1,000	,990	1,011

(1) p de una cola. (2) p de dos colas

Tras el análisis multivariante el único parámetro que permanece como factor independiente predictivo positivo de supervivencia global (p con una o dos colas) es el estadio. El cociente CD4/CD8 tiene valor pronóstico positivo significativo únicamente en el análisis con p de una cola.

Tabla 2. Análisis multivariante para la supervivencia global, los parámetros inmunológicos son los determinados en el mes +3 postransplante.

	Sig.(1)	Sig. (2)	RR	95,0 % IC	
				Inferior	Superior
ESTADIO	,000	,000	,042	,010	,176
IGA	,036	,073	1,007	,999	1,014
LB %	,117	,234	1,206	,886	1,640
IGG	,125	,251	,999	,997	1,001
IGE	,177	,355	,996	,988	1,004
CD4 mm3	,222	,445	,981	,933	1,031
IGM	,260	,521	1,005	,991	1,019
CD8 mm3	,311	,633	,990	,948	1,033
LNK mm3	,332	,664	,977	,879	1,086
CD3 %	,341	,683	1,140	,607	2,142
CD3 mm3	,347	,694	1,010	,963	1,059
LINF. TOTALES	,394	,793	1,002	,985	1,019
CD8 %	,407	,815	,933	,524	1,663
E.MENOPAUSICO	,431	,863	1,156	,223	5,980
CD4 %	,454	,909	,964	,512	1,814
LB mm3	,475	,950	,999	,973	1,026
LNK %	,477	,954	1,042	,257	4,231
CD4/ 8	,484	,969	1,115	,005	247,422
CD34	,485	,971	1,002	,877	1,146

Sig: nivel de significación. RR: Riesgo Relativo. IC: intervalo de confianza.

(1) p de una cola. (2) p de dos colas

Tras el análisis multivariante el único parámetro que permanece como factor independiente predictivo positivo de supervivencia global en el mes +3

postransplante es el estadio tumoral (p con una o dos colas). La Ig A tiene valor pronóstico significativo (pero negativo) únicamente en el análisis con p de una cola.

Tabla 3. Análisis multivariante para la supervivencia libre de progresión, los parámetros inmunológicos son los determinados en el mes +1 postransplante.

	Sig.(1)	Sig.(2)	RR	95,0% IC	
				Inferior	Superior
ESTADIO	,000	,001	,167	,061	,460
LNK %	,030	,060	,659	,427	1,017
IGM	,032	,064	1,014	,999	1,030
CD8 %	,063	,126	,653	,378	1,128
LINF. TOTALES	,073	,146	,996	,991	1,001
CD4 %	,096	,193	,690	,394	1,206
CD3 %	,101	,202	1,448	,820	2,557
LNK mm3	,104	,208	1,015	,992	1,040
IGE	,149	,298	,998	,994	1,002
CD8 mm3	,163	,327	1,017	,983	1,052
CD 4/ 8	,168	,337	,177	,005	6,084
CD34	,180	,361	,949	,848	1,062
CD4 mm3	,189	,378	1,017	,980	1,055
CD3 mm3	,229	,459	,986	,951	1,023
IGA	,264	,529	1,002	,995	1,010
IGG	,348	,696	1,000	,998	1,003
LB %	,398	,796	1,298	,180	9,386
LB mm3	,420	,840	1,014	,888	1,157
E. MENOPAÚSICO	,452	,904	,927	,273	3,148

Sig: nivel de significación. RR: Riesgo Relativo. IC: intervalo de confianza.

(1) p de una cola. (2) p de dos colas

Tras el análisis multivariante el único parámetro que permanece como factor independiente predictivo positivo de supervivencia libre de progresión en el

mes +1 postransplante es el estadio tumoral (p con una o dos colas). El porcentaje de linfocitos NK tienen valor pronóstico positivo significativo, únicamente en el análisis con p de una cola, La concentración de Ig M tiene valor pronostico pero negativo, también solamente en el análisis con p de una cola.

Tabla 4. Análisis multivariante para la supervivencia libre de progresión, los parámetros inmunológicos son los determinados en el mes +3 postransplante.

	Sig.(1)	Sig.(2)	RR	95,0% IC	
				Inferior	Superior
ESTADIO	,000	,000	,150	,055	,406
IGA	,034	,069	1,005	1,000	1,009
LNK %	,161	,332	,648	,269	1,558
LINF. TOTALES	,183	,367	,995	,984	1,006
CD3 mm3	,205	,511	1,011	,979	1,045
IGE	,207	,415	,998	,993	1,003
CD4 mm3	,210	,421	,987	,955	1,019
LB mm3	,225	,451	1,007	,988	1,027
IGG	,250	,511	1,000	,998	1,001
LNK mm3	,268	,536	1,020	,959	1,084
CD8 %	,276	,552	,889	,603	1,311
CD3 %	,311	,622	1,109	,735	1,671
CD 4/ 8	,334	,668	,467	,014	15,136
IGM	,344	,688	1,002	,993	1,011
CD8 mm3	,349	,698	,994	,967	1,023
E. MENOPAUSICO	,356	,713	1,219	,425	3,493
LB %	,416	,833	1,024	,820	1,279
CD4 %	,418	,837	,958	,636	1,443
CD34	,484	,969	1,002	,903	1,112

Sig: nivel de significación. RR: Riesgo Relativo. IC: intervalo de confianza.

(1) p de una cola. (2) p de dos colas

Tras el análisis multivariante el único parámetro que permanece como factor independiente predictivo positivo de intervalo libre de progresión en el mes +3 postransplante es el estadio tumoral. (p con una o dos colas). La concentración de Ig A tiene valor pronóstico significativo (pero negativo) únicamente en el análisis con p de una cola.

V – DISCUSION

1. ANALISIS DESCRIPTIVO

Hemos analizado más de 2000 valores de los distintos parámetros inmunológicos en distintos momentos del tiempo y creo que podemos decir que la recuperación inmunológica en pacientes con carcinoma de mama sometidas a quimioterapia de altas dosis con trasplante autólogo de células progenitoras hematopoyéticas es un proceso complejo.

Nosotros encontramos que tanto los valores absolutos de Linfocitos totales y de Linfocitos CD3+ se encuentran disminuidos en los meses +3 y +6 postransplante recuperándose posteriormente. El valor relativo de los Linfocitos CD3+ permanece estable y dentro del rango normal durante todo el seguimiento.

Los linfocitos CD4 tanto su valor absoluto como el relativo respecto al total de linfocitos T se encuentran disminuidos hasta los 2 años postransplante, recuperándose entonces el valor absoluto pero permaneciendo por debajo del rango de la normalidad su valor relativo durante todo el período de seguimiento.

Los linfocitos CD8 en su valor absoluto aunque en el primer mes postransplante están elevados, permanecen dentro del rango normal durante todo el resto del seguimiento, mientras que su valor relativo se ve aumentado desde el primer mes postransplante hasta el cuarto año de seguimiento.

El cociente CD4/CD8 se ve disminuido desde el primer mes postratamiento y durante todo el seguimiento (justificado por la disminución de los linfocitos CD4 frente al aumento o normalidad de los linfocitos CD8).

Los linfocitos B en su valor absoluto y relativo se ven disminuidos durante los tres primeros meses, recuperándose durante el resto del seguimiento su valor

absoluto pero quedando aumentando su porcentaje respecto al total de linfocitos a partir del primer año y durante el resto del seguimiento.

Los linfocitos NK permanecen dentro del rango normal durante todo el seguimiento excepto en su valor relativo que está disminuido en el mes +1.

La concentración de Inmunoglobulinas se mantiene en el rango normal durante todo el seguimiento excepto los niveles de Ig G e Ig M que están disminuidos en el mes +1 postransplante recuperándose posteriormente.

Existen diversos estudios en la literatura en los que se demuestran alteraciones cuantitativas del sistema inmune en pacientes sometidos a quimioterapia de altas dosis. La mayoría incluyen pacientes con trasplante alogénico y tumores linfo-hematopoyéticos. A destacar una revisión publicada en la revista Blood ⁴⁶. En ella se revisaron los artículos publicados hasta 1998 en todo tipo de tumores sometidos a altas dosis de quimioterapia. Respecto a los distintos parámetros inmunológicos encuentran que dentro de las células T existe una disminución en el número relativo de CD3+ en el primer mes volviendo a rangos normales dentro de los 3 primeros meses. No ocurre lo mismo en el subgrupo de linfocitos CD4+ que se mantiene disminuido durante al menos un año ^{47, 68, 74,75} tras el trasplante. Esta disminución de linfocitos CD4 mantenida se atribuye a la necesidad de la funcionalidad del Timo para la diferenciación de este subgrupo de linfocitos, como se objetiva en niños tratados con altas dosis de quimioterapia ^{76,77}. En cambio el número absoluto y relativo de linfocitos CD8+ se recupera más rápidamente explicándose por la diferenciación extratímica de dicha subpoblación linfocitaria ⁷⁸. A consecuencia de lo anterior tanto en nuestro estudio como en los descritos coincidimos en la inversión del cociente CD4/CD8 que se mantiene durante un largo período de tiempo e incluso años (como en nuestra población). En contraste, al igual que en nuestra observación existe una rápida recuperación tanto de los linfocitos B como de los NK en los primeros meses postransplante,

algunos autores como de Gast et al ⁶⁸ suponen una relación entre el desarrollo de estos dos subgrupos linfoides a partir de las células stem cell, no necesitando el Timo para su desarrollo, justificando así su rápida recuperación. En cuanto a los niveles de inmunoglobulinas, en la revisión publicada en la revista Blood se objetiva una disminución que permanece durante los tres primeros meses tras el trasplante coincidiendo con la recuperación de los linfocitos B.

Tabla 1: Recuperación inmunológica postransplante autólogo de células progenitoras hematopoyéticas en nuestra experiencia comparada con los encontrados en la literatura.

<i>PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS</i>	<i>NUESTRO ESTUDIO (Mes de recuperación)</i>	<i>OTROS ESTUDIOS</i> ^{46,68,74} <i>(Mes de recuperación)</i>
Linfocitos Totales	A partir del mes +6	A partir del mes +3
Linfocitos CD3+	A partir del mes +6	A partir del mes +3
Linfocitos CD4+	A partir de los 2 años	Al menos 1 año
Linfocitos CD8+	Normal o alto	Normal
Cociente CD4/CD8	Bajo todo el seguimiento	Al menos 1 año
Linfocitos B	A partir del mes +3	A partir del mes +3
Linfocitos NK	A partir del mes +1	A partir del mes +1
Inmunoglobulina G	A partir del mes +1	A partir del mes +3
Inmunoglobulina A	Normal todo el seguimiento	A partir del mes +3
Inmunoglobulina M	A partir del mes +1	A partir del mes +3
Inmunoglobulina E	Normal todo el seguimiento	A partir del mes +3

En relación al cáncer de mama pocos son los estudios publicados, pudiendo nombrar un estudio americano en el que Avigan y colaboradores ⁴⁷ examinan la recuperación de la inmunidad celular y humoral en 28 pacientes con carcinoma de mama avanzado sometidas a autotransplante. En dicho estudio se realizaron diferentes medidas de la inmunidad celular y humoral y de su funcionalidad tras el tratamiento de altas dosis. Aunque algunas pacientes habían sido fuertemente tratadas previamente con quimioterapia, la función inmune celular previa al transplante estaba intacta, medida por respuesta DTH (Hipersensibilidad retardada), cociente CD4/CD8, y respuestas de las células T a la estimulación mitogénica. A pesar de que no se produjeron infecciones importantes en el periodo postransplante, profundas deficiencias en la función de las células T fueron observadas, recuperándose parcialmente a los 6-12 meses tras el transplante (experimentando la mayoría de las pacientes una inversión en el cociente CD4/CD8). En contraste la recuperación de la función de las células NK fue recuperada rápidamente, y la mayoría de las pacientes demostraron unos niveles normales de inmunoglobulinas dentro de los 6 primeros meses postransplante. Células Dendríticas generadas "in vitro" desde progenitores de sangre periférica demostraron un fenotipo y función normal en el período postransplante precoz, manifestando un fenotipo característico con expresión rica en moléculas de coestimulación, adhesión, clase II y potentes estimuladores de la proliferación de células T alogénicas.

La respuesta DTH tras la inyección intradérmica de antígeno de *Cándida* fue determinada a la vez que la medida de las células T "in vivo". Las pacientes que desarrollaron un área de induración mayor o igual a 5 mm se les consideró una respuesta intacta. Una reacción positiva a DTH-Antígeno fue observada en el 85% de las pacientes antes de recibir la quimioterapia de altas dosis. En contraste solamente el 32% de las pacientes demostraron una respuesta intacta al mes postransplante. Un aumento gradual en el porcentaje de pacientes con reacciones positivas fue observado en el tiempo con 38, 45, 58 y 80% de las pacientes que

mostraban una respuesta normal a los 3, 6, 9 y 12 meses postransplante respectivamente. Un año después del transplante el 20% de las pacientes permanecían anérgicas.

Tabla 2: Recuperación inmunológica postransplante en pacientes con carcinoma de mama en nuestra experiencia comparado con los encontrados en la literatura.

<i>PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS</i>	<i>NUESTRO ESTUDIO (Mes de recuperación)</i>	<i>AVIGAN ET ALL ⁴⁷ (Mes de recuperación)</i>
Linfocitos Totales	A partir del mes +6	A partir del mes +3
Linfocitos CD3+	A partir del mes +6	A partir del mes +3
Linfocitos CD4+	A partir de los 2 años	Al menos 1 año
Linfocitos CD8+	Normal o alto	Normal
Cociente CD4/CD8	Bajo todo el seguimiento	A partir del mes +12
Linfocitos B	A partir del mes +3	A partir del mes +3
Linfocitos NK	A partir del mes +1	A partir del mes +1
Inmunoglobulina G	A partir del mes +1	Antes del mes +6
Inmunoglobulina A	Normal todo el seguimiento	Antes del mes +6
Inmunoglobulina M	A partir del mes +1	Antes del mes +6
Inmunoglobulina E	Normal todo el seguimiento	Antes del mes +6
Células dendríticas	No valoradas	Normal todo el seguimiento
DTH	No valorado	A partir del mes +12

2. INFLUENCIA DEL ESTADIO DE CANCER DE MAMA EN LA RECUPERACION INMUNOLOGICA

En esta parte del estudio dividiremos los meses de seguimiento en varios períodos:

Período postransplante precoz (meses +1, +3 y +6 tras el tratamiento): en este período se observa que en las pacientes estadio IV respecto a las pacientes estadio II-III tienen aumentados de manera estadísticamente significativa los recuentos absolutos de linfocitos totales, linfocitos T (CD3+), linfocitos CD4+, linfocitos CD8+ y linfocitos NK. En cambio no hemos encontrado diferencias significativas entre los valores porcentuales (%) de los parámetros inmunológicos respecto al total de Linfocitos entre los dos subgrupos, deduciendo que a pesar de que ciertos parámetros se encuentran aumentados en este período precoz tras el transplante, la proporción entre ellos se mantiene intacta. La concentración de Ig A es significativamente menor en las pacientes estadio IV respecto a las pacientes estadio II-III.

Período postransplante intermedio (meses +12, +24 y +36): en el período intermedio postransplante (mes +24) se observa que en las pacientes estadio IV respecto a las pacientes estadio II-III están aumentados de manera estadísticamente significativa el valor relativo de linfocitos CD4 y el cociente CD4/CD8, y disminuidos de manera estadísticamente significativa el valor absoluto y relativo de linfocitos B y la concentración de Ig E.

Período postransplante tardío (mes +48 y en adelante): en el período tardío postransplante, teniendo en cuenta que el número de pacientes se ve reducido, la cifra absoluta de linfocitos es significativamente inferior en las pacientes estadio IV en relación a las pacientes estadio II-III (mes +48), mientras el recuento porcentual de linfocitos T es significativamente mayor (mes +60).

Revisando la literatura actual no hemos encontrado publicaciones que compararan la recuperación inmunológica en series amplias de pacientes con carcinoma de mama sometidas a quimioterapia de altas dosis con trasplante autólogo de células progenitoras hematopoyéticas. Solamente aludir al estudio comentado en el punto anterior donde Avigan y colaboradores⁴⁷ no encuentran diferencias estadísticamente significativas en cuanto al cociente CD4/CD8 entre las pacientes con carcinoma de mama localmente avanzado y las pacientes con enfermedad metastásica, comparando el porcentaje de pacientes con cociente mayor o igual a 1 en los meses +3 y +6 ($p = 1,0$ y $0,1$ respectivamente). Donde sí observan diferencias significativas es en la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH), objetivando al mes del trasplante que el 60% de las pacientes con enfermedad localmente avanzada exhibían una respuesta positiva a DTH en comparación con el 16% de las pacientes con enfermedad metastásica ($p = 0,03$).

Aunque en dicho estudio son pocas las pacientes incluidas en cada subgrupo, podríamos comentar con los hallazgos descritos que aunque algunos parámetros medidos y comparados en nuestro estudio están más elevados de manera significativa en las pacientes con enfermedad metastásica, posiblemente sean aumentos funcionalmente poco efectivos, siendo un punto muy interesante a valorar en posteriores investigaciones.

3. INFLUENCIA DEL NUMERO DE CD34 REINFUNDIDAS EN LA RECUPERACION INMUNOLOGICA

Aunque parecería clara la relación entre el número de CD34 reinfundidas y la recuperación de los parámetros inmunológicos, revisando la literatura hemos encontrado algunos resultados discordantes.

En primer lugar casi ninguno de los estudios presentes en la actualidad en la literatura aborda la recuperación inmunológica postransplante en relación con el número de células CD34 reinfundidas. La mayor parte de estas publicaciones están referidas a enfermedades malignas linfohematopoyéticas, centrándose en la mayoría de los casos en la recuperación plaquetaria, necesidad de transfusiones de plaquetas y el tiempo de recuperación de neutrófilos ⁷⁹⁻⁸⁷, encontrando una relación directamente proporcional y significativa entre el número de CD34 reinfundidas y la recuperación hematológica, incluso en algunos casos como Salazar et al ⁸⁸ encuentran que además de que a mayor número de células CD34 reinfundidas, menor tiempo de recuperación de plaquetas y neutrófilos y que una alta dosis de reinfusión de células progenitoras (cifrando por encima de 5×10^6 cel/kg) estuvo relacionado con una disminución en el tiempo de hospitalización y en el uso de antibióticos. Consecuencia de lo anterior Glaspy et al ⁸⁹ realizan un estudio económico en relación al número de CD34 reinfundidas en pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo objetivando un ahorro en el coste global del tratamiento en aquellas pacientes con una reinfusión de CD34 por encima de 5×10^6 cel/kg de 3900 dólares por paciente en el coste global del tratamiento en relación a las pacientes con reinfusión de CD34 menores.

Como ya hemos comentado existe algún estudio discordante como el de Crystal et al ⁹⁰ en el que en 30 pacientes diagnosticados de Sarcoma de Ewing y Neuroblastoma sometidos a altas dosis de quimioterapia no encontraron diferencias significativas entre la recuperación de los Linfocitos CD3+ y CD8+ y el

número de células CD34 reinfundidas (mediana de $7,2 \times 10^6$ cel/Kg). Tampoco encontraron diferencias significativas que relacionaran el número de CD34 con la recuperación de Linfocitos CD4 a los 3 y 12 meses postratamiento ($p = 0,29$ y $p = 0,26$). Similares hallazgos respecto a la recuperación de los Linfocitos CD4 y CD8 han sido encontrados por otros autores^{91,92}.

En carcinoma de mama pocos son los estudios encontrados y con resultados y orientaciones variables. Nombraremos el de Spencer et al⁹³ que no encuentra correlación entre la cantidad de células CD34 infundidas y el tiempo de recuperación de neutrófilos o plaquetas en 39 pacientes con tumores sólidos. Otro estudio publicado con 70 mujeres diagnosticadas de carcinoma de mama estadios II, III y IV objetiva que una reinfusión mayor o igual a 8×10^6 cel/Kg de CD34 no estuvo asociado de forma estadísticamente significativa con una mejor recuperación en la cifra de neutrófilos tras el autotransplante en comparación con las pacientes con reinfusión por debajo de 8×10^6 cel/Kg⁹⁴. Glaspy et al⁹⁵ en un estudio de 215 pacientes con carcinoma de mama de alto riesgo muestran que aumentando el número de CD34 reinfundidas de 2×10^6 cel/kg a 5×10^6 cel/Kg aumenta la probabilidad de recuperación plaquetaria del 65% al 85% de las pacientes (considerando la misma cuando el número es mayor o igual a 20×10^9 /L entre los primeros 14 días tras el transplante).

En conclusión, decir que no existen estudios actualmente en la literatura en carcinoma de mama que confirmen que existe una relación entre los diferentes parámetros inmunológicos que estamos estudiando y la cantidad de CD34 reinfundidas, posiblemente porque el número de CD34 que reinfundimos para asegurar la recuperación inmunológica ya es un valor asignado (como mínimo de $2,5 \times 10^6$ cel/ Kg y en la mayoría de los estudios anteriores por encima de 5×10^6 cel/ Kg).

Nuestros datos sí muestran una recuperación inmunológica diferente según el número de células CD34 reinfundidas (mediana de $4,6 \times 10^6$ cel/Kg), encontrando que en la fase precoz postransplante las pacientes con mayor cantidad de CD34 experimentan un aumento significativo del número de linfocitos CD4 y NK en el mes +1. En el mes +3 los linfocitos NK siguen aumentados en su valor porcentual así como el cociente CD4/CD8 y la Inmunoglobulina M en las pacientes con mayor número de CD34. En cuanto a los demás parámetros, llama la atención una disminución tanto en los Linfocitos totales en el mes +3, como en los linfocitos CD3+ que se mantienen disminuidos hasta el primer año de seguimiento, posiblemente a costa de los linfocitos CD8 que también están disminuidos.

A largo plazo, se mantienen diferencias estadísticamente significativas entre las pacientes con una reinfusión de CD34 por encima de la mediana respecto a las pacientes con reinfusión mas baja de CD34, encontrándose un aumento a los dos años del transplante de los Linfocitos B y una disminución de los Linfocitos CD3+. A los 4 años se objetiva un aumento del cociente CD4/CD8 de manera significativa y a los 6 años a pesar del limitado número de pacientes se objetiva una diferencia estadísticamente significativa con aumento de los Linfocitos CD3, CD4, CD8, B y NK en aquellas pacientes con reinfusión de CD34 por encima de la mediana.

4. FACTORES PRONOSTICOS DE SUPERVIVENCIA

4.1 SUPERVIVENCIA GLOBAL.

En el análisis univariante los parámetros que influyen significativamente en la supervivencia global en nuestro estudio son: el estadio, existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre las paciente estadio II-III respecto a las pacientes estadio IV ($p = 0,001$) y la recuperación inmunológica precoz de los linfocitos CD4 (recuento porcentual en el mes +3 con una $p = 0,00$), linfocitos CD8 (recuento porcentual en el mes +1 con una $p = 0,05$ y en el mes +3 con $p = 0,02$) y linfocitos NK (recuento absoluto en el mes +1 con una $p = 0,04$).

Todos los parámetros anteriores tienen un impacto positivo en la supervivencia, excepto el porcentaje de linfocitos CD8 en el mes +3 que tiene un impacto negativo (es decir a mayor porcentaje de linfocitos CD8 en el mes +3 peor supervivencia global de las pacientes).

En el análisis multivariante, solamente el estadio conserva un valor pronóstico independiente de supervivencia global (p de una o dos colas). La concentración de Ig A en el mes +3 postransplante y el cociente CD4/CD8 tienen valor pronóstico significativo únicamente en el análisis con p de una cola, teniendo el cociente CD4/CD8 impacto positivo en la supervivencia (a mayor cociente mejor supervivencia), pero la Inmunoglobulina A tiene un impacto negativo (a mayor concentración de Inmunoglobulina A en el mes +3 peor supervivencia global).

4.2 SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESION.

En el análisis univariante los parámetros que influyen significativamente en la supervivencia libre de progresión en nuestro estudio son: el estadio, existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre las paciente estadio II-III

respecto a las pacientes estadio IV ($p = 0,001$) y la recuperación inmunológica precoz de los linfocitos CD4 (recuento absoluto en el mes +1 con $p = 0,01$ y recuento porcentual en el mes +3 con una $p = 0,01$), linfocitos CD8 (recuento porcentual en el mes +3 con $p = 0,03$), linfocitos B (recuento absoluto en el mes +1 con $p = 0,00$ y recuento porcentual en el mes +1 con $p = 0,01$) y linfocitos NK (recuento absoluto mes +1 con $p = 0,04$).

Todos los parámetros anteriores tienen un impacto positivo en la supervivencia libre de progresión, excepto el porcentaje de linfocitos CD8 en el mes +3 que tiene un impacto negativo (es decir a mayor porcentaje de linfocitos CD8 en el mes +3 peor supervivencia libre de progresión de las pacientes) y los linfocitos B en el mes +1 (tanto su valor absoluto como porcentual).

En el análisis multivariante, solamente el estadio conserva un valor pronóstico independiente de supervivencia libre de progresión (p de una o dos colas). Los linfocitos NK (valor porcentual mes +1), la concentración de Ig M en el mes +1 y la concentración de Ig A en el mes +3 postransplante tienen valor pronóstico significativo únicamente en el análisis con p de una cola, teniendo el porcentaje de linfocitos NK un impacto positivo en la supervivencia (a mayor porcentaje de linfocitos NK en el mes +1 mejor supervivencia libre de progresión), pero la Inmunoglobulina M en el mes +1 y la Inmunoglobulina A en el mes +3 tienen un impacto negativo (a mayor concentración de Inmunoglobulina M en el mes +1 e Inmunoglobulina A en el mes +3 peor supervivencia libre de progresión).

Respecto a los datos en la literatura actual sobre la implicación de la recuperación inmunológica en pacientes sometidos a quimioterapia de altas dosis y su relación con la supervivencia global y supervivencia libre de progresión comenzaremos nombrando varios estudios como los de Luis F. Porrata y colaboradores de la Clínica Mayo donde estudian la relación entre el nº total de Linfocitos en el día +15 postransplante y su relación con la supervivencia en

pacientes con cáncer de mama metastásico ⁷⁰ mieloma múltiple, linfoma no-Hodgkin ⁶⁴ y leucemia mieloide aguda ⁶⁵ obteniendo cifras tan significativas como que entre 29 pacientes con cáncer de mama metastásico sometidas a altas dosis de quimioterapia y cuyo recuento de linfocitos totales era menor a 500 en el día +15, su supervivencia global al año era del 50% en comparación con aquellas pacientes cuyo recuento era mayor a 500 cuya supervivencia fue del 91%. También hubo diferencias significativas respecto a la supervivencia libre de progresión que fue de 17% vs 56% respectivamente. Teniendo en cuenta (como ya hemos comentado anteriormente) que los linfocitos NK son precozmente recuperados el autor propone que pudieran ser responsables de las diferencias en la supervivencia dado que es conocido su relación en la regresión tumoral ^{97,98} (en nuestro estudio era uno de los parámetros relacionados significativamente con el intervalo libre de progresión), estas diferencias se repitieron en las otras patologías a estudio, sin embargo Schrama et al ⁹⁹ no encuentran diferencias ni en supervivencia ni en tiempo libre de progresión en 41 pacientes con carcinoma de mama metastásico realizando la misma medición de linfocitos totales en el día +15 postransplante. Nosotros tampoco hemos encontrado diferencias significativas en la supervivencia global de las pacientes en relación al número de linfocitos totales valorados en el primer mes tras el transplante ($p = 0,34$) ni en la supervivencia libre de progresión ($p = 0,21$).

Otro estudio interesante con un alto número de pacientes es el publicado por Nieto et al ⁹⁶ que analizan también el efecto del número de linfocitos totales en el día +15 postransplante en la supervivencia global y libre de progresión en 476 pacientes con carcinoma de mama (264 con carcinoma de mama de alto riesgo y 212 con carcinoma de mama metastásico) sometidas a altas dosis de quimioterapia. En un período de seguimiento de 8 años encuentran que la recuperación precoz de linfocitos totales es un factor independiente de aumento de supervivencia global y de tiempo a la progresión pero solamente en el grupo de pacientes con enfermedad metastásica. En la misma línea Blake-Mortimer et al ¹⁰⁰

objetivan en 113 mujeres con carcinoma de mama metastásico sometidas a autotransplante una relación directamente proporcional entre la rapidez de recuperación del número de linfocitos T (CD3+) y la supervivencia, sin embargo no encuentran relación de la supervivencia con la velocidad de recuperación de los linfocitos totales ni de linfocitos CD8.

En nuestro estudio incluíamos en el análisis multivariante el número de CD34 reinfundidas sin encontrar relación significativa con la supervivencia global ni con la supervivencia libre de progresión, en esta línea nombrar varios estudios con resultados discordantes como el de Hensel et al ¹⁰¹ que encuentran que una reinfusión de CD34 por encima de $7,8 \times 10^6$ cel/kg influye significativamente encontrando supervivencias mas largas en pacientes con carcinoma de mama metastásico. Por el contrario Braunschweig et al ¹⁰² también en pacientes con carcinoma de mama divide a éstas en subgrupos según el número de células CD34 reinfundidas (1.0-3.5, 3.6-5.9, 6.0-19.9 y por encima de 20.9×10^6 cel/kg) no objetivando relación entre ninguno de los subgrupos y la supervivencia, tampoco Porrata et al ⁷⁰ encuentran relación entre el número de CD34 reinfundidas y la supervivencia ni en un estudio publicado por Lima et al ⁷³ en linfomas no-Hodgkin donde a pesar de que un alto número de CD34+ se correlacionaba con más rápida recuperación del período de aplasia, no se encontró relación con la supervivencia.

En nuestra muestra, la mayor parte de las pacientes se encontraban en un rango de reinfusión de CD34 entre 3 y 6×10^6 cel/kg, y no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el número de células reinfundidas en las pacientes estadio II-III de las pacientes con enfermedad metastásica, ello posiblemente limite la capacidad para encontrar diferencias significativas respecto a la supervivencia.

Respecto al resto de parámetros que hemos encontrado relacionados significativamente con la supervivencia global y la supervivencia libre de

progresión poca literatura hemos encontrado al respecto en la actualidad, citar recientemente a Borg et al ¹⁰³ que realizan un estudio prospectivo en tumores sólidos de cualquier localización tratados con quimioterapias convencionales en una sola institución en un año, recogiendo 213 pacientes, cuantifican en el día +1 de tratamiento los subgrupos linfocitarios CD3, CD4, CD8, CD19 y CD56 y los correlacionan con el fallecimiento en los siguientes 31 días, objetivando que el recuento de CD4 por debajo de 450 /muL fue un factor independiente de riesgo de fallecimiento precoz (el 87% de los pacientes que fallecieron antes del día 31 postquimioterapia tenían un número de CD4 por debajo de 450/muL).

En otro tipo de tumores podemos destacar un artículo publicado ⁷² en 38 pacientes diagnosticadas de carcinoma de ovario estadios IIIB y IV, sometidas a quimioterapia de altas dosis, donde se realiza una única medición en el mes +12 postransplante de linfocitos CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ y linfocitos NK, objetivándose que la recuperación de un adecuado número de CD3+, CD4+ y CD8+ son marcadores independientes de mayor tiempo a la progresión y supervivencia global. En nuestro estudio no consideramos realizar los análisis pronósticos en el mes +12 puesto que casi el 50% de las pacientes estadio IV estaban en progresión al año del transplante.

En otro estudio Coreano ¹⁰⁴ con 39 pacientes diagnosticados de linfomas no-Hodgkin objetivan que un número de linfocitos totales por encima de 1000 en el día 25 postransplante es un predictor independiente de mejor supervivencia libre de progresión y global.

Como vemos no existen muchos estudios sobre el tema que nos ocupa y los que tenemos en la actualidad son de contenido variado y resultados diversos. Pensamos que el interés de la recuperación inmunológica es creciente y que sus posibles implicaciones pronósticas y terapéuticas justifican futuros estudios tanto en carcinoma de mama como en otros tipos de tumores.

VI- CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La recuperación inmunológica postransplante es un proceso complejo y progresivo en el tiempo. Las células que mas precozmente se recuperan son los linfocitos NK (primer mes postransplante), los linfocitos B y las Inmunoglobulinas (primer trimestre), seguidamente se recuperan los linfocitos totales y linfocitos CD3+ (primer semestre). Los linfocitos CD8+ permanecen dentro del rango de la normalidad durante todo el seguimiento (incluso aumentado su valor relativo hasta el cuarto año) en contraste con los linfocitos CD4 que se encuentran disminuidos durante años (dos años su valor absoluto y durante todo el seguimiento su valor relativo). En consecuencia el cociente CD4/CD8 se ve disminuido desde el primer mes postratamiento y durante todo el seguimiento.
2. Existen diferencias estadísticamente significativas en la recuperación inmunológica entre las pacientes con carcinoma de mama estadio II-III y las pacientes con carcinoma de mama estadio IV, sometidas a quimioterapia de altas dosis.
3. Existen diferencias estadísticamente significativas en la recuperación inmunológica entre las pacientes con carcinoma de mama sometidas a quimioterapia de altas dosis, en dependencia del número de CD34 reinfundidas.
4. El estadio tumoral en el cáncer de mama no influye de manera significativa en la cantidad de células CD34 reinfundidas.
5. En el análisis univariante los parámetros que influyen significativamente en la supervivencia global son el estadio y la recuperación inmunológica precoz de los linfocitos CD4, CD8 y NK. En el análisis multivariante, el

estadio, la concentración de Ig A y el cociente CD4/CD8 tienen valor pronóstico independiente para la supervivencia global.

6. En el análisis univariante los parámetros que influyen significativamente en la supervivencia libre de progresión son el estadio y la recuperación inmunológica precoz de los linfocitos CD4, CD8, linfocitos B y NK. En el análisis multivariante el estadio, la concentración de Ig A e Ig M y los linfocitos NK tienen valor pronóstico independiente para la supervivencia libre de progresión.

VII- BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

1. Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Gao YT, Ferlay J, Powell J: Cancer Incidence in Five Continents.Vol.VI. Lyon: International Agency for Research on Cancer. Scientific Publication N° 120, 1992.
2. Parkin DM, Lara E, Muir CS:Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J Cancer* 1988; 41:184-197.
3. Izquierdo A, Viladiu P, Borràs J, Galceran J, Borràs JM, Bosch X y cols.: El riesgo del cáncer de mama en Cataluña. *Med Clin (Barc)*1996;11:410-3.
4. Viladiu P, Izquierdo A, de Sanjosé S, Bosch FX: A breast cancer case-control study in Girona,Sapin.Endocrine, familial and lifestyle factors.*European Journal of Cancer Prevention* 1996;5:329-335.
5. Ford D y cols.:Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *Lancet* 1994;343 (8899):692-95.
6. Hall JM y cols.:Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21.*Science* 1990;250:1684-9.
7. Friedman LS y cols.:Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families.*Nature Genetics*1994;8(4):399-404.
8. Miki Y y cols.:A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1.*Science* 1994; 266:66-71.
9. Wooster R y cols.:Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1996;379:749.
10. Wooster R y cols.:Localization of breast cancer susceptibility gene, BRCA2,to chromosome 13q12-13.*Science* 1994; 265:2088-2090.
11. Malkin D y cols.:Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer,sarcomas and other neo-plasms, *Science* 1990;250:1234-1238.
12. Swift M y cols.:Incidence of cancer in 161 families affected by ataxiatelangiectasia. *N Engl J Med* 1991;325:1831-36.
13. Theodore G y cols.:An association between the risk of cancer mutations in the HRAS1 minisatellite locus. *N Engl J Med* 1993;329:517-523.

14. Breast. In: American Joint Committee on Cancer.: AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed. New York, NY: Springer, 2002, pp 171-180.
15. Singletary SE, Allred C, Ashley P, et al.: Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 20 (17): 3628-36, 2002.
16. Woodward WA, Strom EA, Tucker SL, et al.: Changes in the 2003 American Joint Committee on Cancer staging for breast cancer dramatically affect stage-specific survival. *J Clin Oncol* 21 (17): 3244-8, 2003.
17. Fisher B, Redman C, Possion R y cols.: Eight-year results of as randomized clinical trial comparing total mastectomy and lumpectomy with or without irradiation in the treatmentof breast cancer. *New Eng. J. Med* 1989; 320:822-828.
18. Consens Development Conference in the Treatment of Early-Stage Breast Cancer. *Monogr. J Natl Cancer Inst.* 1992, 11:1-5.
19. Touboul E, Buffat C, Lefranc JP: Possibility of conservative local treatment after combined chemotherapy and radiotherapy, with or without surgery. *Int J Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1992; 25:167-175.
20. Veronesi V, Luini A, Del Vecchio M y cols.: Radiotherapy after breast – preserving surgery in woman with localized cancer of the breast. *New Eng J Med* 1993; 328:1587-1991.
21. Monyak D y Levitt S: The changing role of radiation therapy in the treatment of primary breast cancer. *Invest Radiol* 1989; 24:483-494.
22. Fisher B: The evolution of paradigms for the management of breast cancer: a personal perspective. *Cancer Res* 1992; 52:2371-83.
23. Early Breast Cancer Trialists Cooperative Group. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic or inmune therapy. 133 randomised trials involving 31000 recurrences and 24000 deaths among 75000 women. *Lancet* 1992; 339;1-15,71-85.

24. Fossati R, Confalonieri C, Torri V, et al. Cytotoxic and hormonal treatment for metastatic breast cancer : A systematic review of published randomized trials involving 31.510 women. *J. Clin Oncol* 1998;16:3439-3460.
25. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *New Engl J Med* 2001;344:783-792.
26. Seidman AD, Fornier MN, Esteva FJ, et al. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification. *J. Clin Oncol* 2011; 19: 2587-2595.
27. Peters WP, Ross M, Vrdenburgh JJ, et al. High -dose chemotherapy and autologous bone marrow support as consolidation after standar-dose adjuvant therapy for high-risk primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1993;11:1132-43.
28. Gianni AM, Siena S, Bregni M et al, Growth factor supported high-dose sequential adjuvant chemotherapy in breast cancer with > 10 positive nodes. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1992; 11:60.
29. Hortobagyi GN, Buzdar AU, Bodey GP et al, High dose induction chemotherapy of metastatic breast cancer in protected environment units: a prospective randomized study. *J Clin Oncol* 1987; 5:178-84.
30. Peters WP, Shapll EJ, Jones RB et al, High-dose combination alkilating agents with bone marrow support as initial treatment for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1988; 6:1368-76.
31. Antman K, Rowlings PA, Vaughan WP et al, High-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem-cell support for breast cancer in North America. *J Clin Oncol* 1997; 15:1870-9.
32. Pedrazzoli P, Ferrante P, Kulekci A et al, Autologous hematopoietic stem cell transplantation for breast cancer in Europe: critical evaluation of data from the European Group and Marrow Transplantation (EBMT) Registry 1990-1999. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 489-494.

33. Hortobagyi GN, Buzdar AU, Theriault RL, et al: Randomized trial of high-dose chemotherapy and blood cell autografts for high-risk primary breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 92:225-233, 2000.
34. Rodenhuis S, Richel DJ, van der Wall E, et al: Randomised trial of high-dose chemotherapy and haemopoietic progenitor-cell support in operable breast cancer with extensive axillary lymph-node involvement. *Lancet* 352:515-521, 1998.
35. Peters W, Rosner G, Vredenburgh J, et al: A prospective randomized comparison of two doses of combination alkylating agents as consolidation after CAF in high-risk primary breast cancer involving ten or more axillary lymph nodes: Preliminary results of CALGB 9082/SWOG 9114/NCIC MA-13. *Proc Am Soc Clin Oncol* 18:1a, 1999 (abstr 2)
36. Peters WP, Rosner G, Vredenburgh J, et al: Updated results of a prospective, randomized comparison of two doses of combination alkylating agents as consolidation after CAF in high-risk primary breast cancer involving ten or more axillary lymph nodes: CALGB 9082/SWOG 9114/NCIC MA-13. *Proc Am Soc Clin Oncol* 20:21a, 2001 (abstr 81)
37. Bergh J, Wiklund T, Erikstein B, et al: Tailored fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide compared with marrow-supported high-dose chemotherapy as adjuvant treatment for high-risk breast cancer: A randomised trial—Scandinavian Breast Group 9401 study. *Lancet* 356:1384-1391, 2000.
38. Crown JP, Lind M, Gould A, et al: High-dose chemotherapy (HDC) with autograft (PBP) support is not superior to cyclophosphamide (CPA), methotrexate and 5-FU (CMF) following doxorubicin (D) induction in patients (pts) with breast cancer (BC) and 4 or more involved axillary lymph nodes (4+ LN): The Anglo-Celtic I study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 21:42a, 2002 (abstr 166)
39. Gianni A, Bonadonna G: Five-year results of the randomized clinical trial comparing standard versus high-dose myeloablative chemotherapy in the

- adjuvant treatment of breast cancer with > 3 positive nodes. Proc Am Soc Clin Oncol 20:21a, 2001 (abstr 80)
40. Roche HH, Pouillard P, Meyer N, et al: Adjuvant high dose chemotherapy (HDC) improves early outcome for high risk (N>7) breast cancer patients: The Pegase 01 Trial. Proc Am Soc Clin Oncol 20:26a, 2001 (abstr 102) .
 41. Rodenhuis S, Bontenbal M, Beex LV, et al: High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for high-risk breast cancer. N Engl J Med 349:7-16, 2003.
 42. Tallman MS, Gray R, Robert NJ, et al: Conventional adjuvant chemotherapy with or without high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation in high-risk breast cancer. N Engl J Med 349:17-26, 2003...
 43. Zander AR, Kroger N, Schmoor C, et al: High-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem-cell support versus standard-dose chemotherapy in breast cancer patients with 10 or more positive lymph nodes: First results of a randomized trial. J Clin Oncol 22:2273-2283, 2004.
 44. Porcelli SA, Modlin RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. Annu Rev Immunol 1999;17:297-329.
 45. Staveley-o'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J et al. Induction of antigen-specific T cell anergy: an early event in the course of tumor progression. Immunology 1998;95(3):1178-1183.
 46. Thierry Guillaume, Daniel B. Rubinstein, and Michel Symann, Immune reconstitution and immunotherapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation. Blood 1998;92(3):1471-1490.
 47. Avigan D, Wu Z, Joyve R et al, Immune reconstitution following high-dose chemotherapy with stem cell rescue in patient with advanced breast cancer. Bone Marrow Transplant 2000; 26:169-176.
 48. Sugita K, Soiffer RJ, Murray C et al: The phenotype and reconstitution of immunoregulatory T cell subsets after T-cell-depleted allogeneic and autologous bone marrow transplantation. Transplantation 1994;57:1465.

49. Olsen GA, Gockerman JP, Bast RC et al: Altered immunologic reconstitution after standar-dose chemotherapy or high dose chemotherapy with autologous bone marrow support. *Transplantation* 1988;46:57.
50. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR et al: Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med* 1995;332:143.
51. Mackall CL, Fleiser TA, Brown MR et al: Dinstinction between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood* 1997;89:3700.
52. Storek J, Witherspoon RP, Storb R: T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life. *Bone Marrow Tranplant* 1995;16:413.
53. Talmadge JE, Reed EC, Kessinger A, Kuszynski CA, Perry GA, Gordy CL, Mills KC, Thomas ML, Pirruccello SJ, Letheby BA, Arneson MA, Jackson JD: Immunologic attributes of cytokine mobilized peripheral blood stem cells and recovery following transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1996;17:101.
54. Ashihara E, Shimazaki C, Yamagata N, Hirata T, Okawa K, Oku N, Goto H, Inaba T, Fujita N, Nakagawa M: Reconstitution of lymphocyte subsets after peripheral blood stem cell transplantation: Two-color flow cytometric analysis. *Bone Marrow Transplant* 1994;13:377.
55. Hackett J, Bosma GC, Bosma MJ, Bennett M, Kumar V: Transplantable progenitors of natural killer cells are distinct from those of T and B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 93:3427.
56. Small TN, Keever CA, Weiner-Fedus S, Heller G, O'Reilly RJ, Flomenberg N: B-cell differentiation following autologous, conventional, or T-cell depleted bone marrow transplantation: A recapitulation of normal B-cell ontogeny. *Blood* 1990; 76:1647.
57. Bengtsson M, Smedmyr B, Festin R, Öberg G, Simonsson B, Tötterman TH: B lymphocyte regeneration in marrow and blood after autologous bone

- marrow transplantation: Increased numbers of B cells carrying activation and progression markers. *Leuk Res* 1989;13:791.
58. Flamand V, Sornasse T, Thielemans K, Demanet C, Bakkus M, Bazin H, Thielemans F, Leo O, Urbain J, Moser M: Murine dendritic cells pulsed in vitro with tumor antigen induce tumor resistance in vivo. *Eur J Immunol* 1994;24:605.
59. Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, Zitvogel L, Celluzzi C, Falo LD, Melief CJ, Ildstad ST, Kast WM, DeLeo AB: Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumor peptides elicit protective and therapeutic antitumor immunity. *Nat Med* 1995;1:1297.
60. Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, DeLeo AB, Clarke MR, Lotze MT, Storkus WJ: Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: Dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J Exp Med* 1996;183:87.
61. Gong J, Avigan D, Chen D et al. Activation of antitumor cytotoxic T lymphocytes by fusions of human dendritic cells and breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2715-2718.
62. Talmadge JE, Reed E, Ino K, Kessinger A, Kuszynski C, Heimann D, Varney M, Jackson J, Vose JM, Bierman PJ: Rapid immunologic reconstitution following transplantation with mobilized peripheral blood stem cells as compared to bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 1997;19:161.
63. Ashihara E, Shimazaki C, Yamagata N, Hirata T, Okawa K, Oku N, Goto H, Inaba T, Fujita N, Nakagawa M: Reconstitution of lymphocyte subsets after peripheral blood stem cell transplantation: Two-color flow cytometric analysis. *Bone Marrow Transplant* 1994;13:377.
64. Porrata LF, Gertz M, Inwards DJ et al, Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous hemtopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma or non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2001; 98:579-585.
65. Porrata LF, Litzow MR, Tefferi A et al, Early Lymphocyte recovery is a predictive factor for prolonged survival after autologous hematopoietic stem

- cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 2002; 16:1311-1318.
66. Ageitos AG, Ino K, Ozerol I et al, Restoration of T and NK cell in GM-CSF mobilized stem cell products from breast cancer patients by monocyte depletion. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20:117-123.
67. Ronald L, Paquette T, Dergham T et al, Ex vivo expanded unselected peripheral blood: progenitor cells reduce posttransplantation neutropenia, thrombocytopenia, and anemia in patients with breast cancer. *Blood* 2000; 96:2385-2390.
68. De Gast GC, Vyth-Dresse FA, Nooijen W et al, Reinfusion of autologous lymphocytes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces rapid recovery of CD4 and CD8 T cells after high-dose chemotherapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 20:58-64.
69. Stewart A, Vescio R, Schiller G et al, Purging of autologous peripheral-blood stem cells using CD34 selection does not improve overall or progression-free survival after high-dose chemotherapy for multiple myeloma: results of a multicenter randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 2001; 19:3771-3779.
70. Porrata LF, Ingle JN, Litzow MR et al, Prolonged survival associated with early lymphocyte recovery after autologous hematopoietic stem cell transplantation for patients with metastatic breast cancer. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28:865-871.
71. Chakraborty NG, Bilgrami S, Maness LJ et al, Myeloablative chemotherapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation for metastatic breast cancer: immunologic consequences affecting clinical outcome. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24:837-843.
72. Ferrandina G, Pierelli L, Perillo A et al, Lymphocyte recovery in advanced ovarian cancer patients after high-dose chemotherapy and peripheral blood stem cell plus growth factor support. *Cl.in Can Res* 2003; 9: 195-200.
73. Limat S, Woronoff-Lensi MC, Milpied N et al, Effect of cell determinant CD34+ cell dose on the cost and consequences of peripheral blood stem

- cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma patients in front-line therapy. *Europ J of cancer* 2000;36:2360-2367.
74. Reimer P, Kunzmann V, Wilhelm M et al, Cellular and humoral immune recostitution after autologous peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT). *An of Hematology* 2003;82:263-270.
75. Zambelli A, Montagna D, Da Prada GA et al, Evaluation of infectious complications and immune recovery following high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in 148 breast cancer patients. *Anticancer Res*, 2002; 22(6B): 3701-8.
76. MacKall CL, Fleisher TA, Brown MR, et al, Age, thymopoiesis and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med* 1995; 332:143 – 149.
77. Mackall CL, Hakim FT, Gress RE, T-cell regeneration: All repertoires are not created equal. *Immunol Today* 1997; 18:245-251.
78. Dumont-Girard F, Roux E, Van Lier RA, et al, Reconstitution of the T-cell compartment after bone marrow transplantation. *Blood* 1998; 92:1471-1490.
79. Haas R, Möhle R, Frühauf S, et al: Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. *Blood* 1994; 83:3787-3794.
80. Faucher C, Le Corroller AG, Chabannon C, et al: Autologous transplantation of blood stem cells mobilized with filgrastim alone in 93 patients with malignancies: The number of CD34+ cells reinfused is the only factor predicting both granulocyte and platelet recovery. *J Hematother* 1996; 5:663-670.
81. Kiss JE, Rybka WB, Winkelstein A, et al: Relationship of CD34⁺ cell dose to early and late hematopoiesis following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19:303-310.
82. Dercksen MW, Rodenhuis S, Dirkson MKA, et al: Subsets of CD34+ cells and rapid hematopoietic recovery after peripheral-blood stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 1995; 13:1922-1932.

83. Ketterer N, Salles G, Raba M, et al: High CD34+ cell counts decrease hematologic toxicity of autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Blood* 1998; 91:3148-3155.
84. 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.
85. Van der Wall E, Richel DJ, Holtkamp MJ, et al: Bone marrow reconstitution after high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: Effect of graft size. *Ann Oncol* 1994; 5:795-802.
86. Beguin Y, Baudoux E, Sautois B, et al: Hematopoietic recovery in cancer patients after transplantation of autologous peripheral blood CD34+ cells or unmanipulated peripheral blood stem and progenitor cells. *Transfusion* 1998 38:199-208.
87. 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.
88. Salazar R, Sola C, Maroto P, et al: Factors affecting CD34+ cell mobilization with cyclophosphamide + G-CSF and hematopoietic recovery after high-dose chemotherapy and stem cell support in solid tumour pts. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1996; 17:95 (a).
89. Glaspy J, Lu ZJ, Wheeler C, et al: Economic rationale for infusing optimal numbers of CD34+ cells in peripheral blood progenitor cell transplants (PBPCT). *Blood* 1997; 90:370a, (suppl 1) (abstr 1646) .
90. Crystal L, Mackall, Dagmar Stein, Thomas A. Fleisher, et al : prolonged CD4 depletion after sequential autologous peripheral blood progenitor cell infusions in children and young adults. *Blood* 2000; 96 : 754-762.

91. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, et al. Distinctions between CD8+ and CD4+ T cell regenerative pathways result in prolonged T cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood*. 1997;89:3700-3707.
92. Hakim FT, Cepeda R, Kaimei S, et al. Constraints on CD4 recovery post chemotherapy in adults: thymic insufficiency and apoptotic decline of expanded peripheral CD4 cells. *Blood*. 1997;90:3789-3798.
93. Spencer V, Smith J, Kulkarni S, et al: Does transplantation of a high number of CD34+ cells predict more rapid engraftment following high-dose chemotherapy (hdc). *Proc Am Soc Clin Oncol* 11:131, 1992 (abstr 347).
94. Klumpp TR, Goldberg SL, Magdalinski AJ, et al: Phase II study of high-dose cyclophosphamide, etoposide and carboplatin (CEC) followed by autologous hematopoietic stem cell rescue in women with metastatic or high-risk non-metastatic breast cancer: Multivariate analysis of factors affecting survival and engraftment. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20:273-281.
95. Glaspy JA, Shpall EJ, LeMaistre CF, et al: Peripheral blood progenitor cell mobilization using stem cell factor in combination with filgrastim in breast cancer patients. *Blood* 1997; 90:2939-2951.
96. Nieto Y, Shpall EJ, McNiece IK, et al: Prognostic analysis of early lymphocyte recovery in patients with advanced breast cancer receiving high-dose chemotherapy with an autologous hematopoietic progenitor cell transplant. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(15):5076-86.
97. Maiche AG, Jekunen A, Rissanen P et al: Sudden tumour regression with enhanced natural killer cell accumulation in a patient with stage IV breast cancer. *Eur J Cancer* 1994; 30A: 1642-1646.
98. Wong PY, Staren ED, Tereshkova N, Braun DP. Functional analysis of tumor-infiltrating leukocytes in breast cancer patients. *J Surg Res* 1998; 76: 95-103.
99. Schrama JG, Rodenhuis S, de Gast GC: Prolonged survival associated with early lymphocyte recovery after autologous hematopoietic stem cell

- transplantation for patients with metastatic breast cancer. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 31(2):141-2.
100. Blake-Mortimer JS, Sephton SE, Carlson RW, Stites D, Spiegel D: Cytotoxic T lymphocyte count and survival time in women with metastatic breast cancer. *Breast J.* 2004;10(3):195-9.
101. Hensel M, Schneeweiss A, Sinn HP, et al: Stem cell dose and tumorbiologic parameters as prognostic markers for patients with metastatic breast cancer undergoing high-dose chemotherapy with autologous blood stem cell support. *StemCells.* 2002;20(1):32-40.
102. Braunschweig I, Mirza NQ, Rondon G, et al: High CD34 cell doses do not worsen regimen-related toxicity or early mortality after autologous blood stem cell transplantation for breast cancer. *Cytotherapy.* 2000;2(2):105-10.
103. Borg C, Ray-Coquard I, Philip I, et al: CD4 lymphopenia as a risk factor for febrile neutropenia and early death after cytotoxic chemotherapy in adult patients with cancer. *Cancer.* 2004 ;101(11):2675-80.
104. Kim H, Sohn HJ, Kim SE, et al: Lymphocyte recovery as a positive predictor of prolonged survival after autologous peripheral blood stem cell transplantation in T-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* 2004; 34(1):43-9.
-