



# VNiVERSIDAD D SALAMANCA

---

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**FACTORES DIAGNÓSTICOS ENDOSCÓPICOS Y PRONÓSTICOS  
RELACIONADOS CON EL HELICOBACTER PYLORI EN LA  
ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUÉSPED TRAS EL  
TRASPLANTE ALOGÉNICO DE CÉLULAS  
HEMATOPOYÉTICAS**

Memoria presentada por Don Antonio Velasco Guardado para optar al grado de Doctor.



Se presenta este documento a modo de tesis doctoral para optar al título de “Doctor en Medicina” por la Universidad de Salamanca. Se ha elaborado en base al contenido de dos trabajos publicados en revistas científicas y un tercer trabajo en fase de revisión que en conjunto adquieren una adecuada relevancia, originalidad y excelencia. Los artículos se detallan a continuación:

### **ARTÍCULO 1**

**Título:** *HELICOBACTER PYLORI INFECTION AND GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE.*

**Autores:** Antonio Velasco Guardado<sup>1</sup>, Lucía López Corral<sup>2</sup>, Jose Antonio Pérez Simón<sup>2</sup>, Teresa Caballero Velázquez<sup>2</sup>, Teresa Flores Corral<sup>3</sup>, Dolores Caballero Barrigón<sup>2</sup>, Antonio Rodríguez Pérez<sup>1</sup>.

**Afiliación:** <sup>1</sup>Servicio de Aparato Digestivo; <sup>2</sup>Hematología; y <sup>3</sup>Anatomía Patológica, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

**Referencia:** Biol Blood Marrow Transplant. 2011 May;17(5):765-9.

**DOI:** 10.1016/j.bbmt.2010.11.014.

### **ARTÍCULO 2**

**Título:** *EVALUACIÓN ENDOSCÓPICA Y HALLAZGOS HISTOLÓGICOS EN LA ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUESPED.*

**Autores:** Antonio Velasco Guardado<sup>1</sup>, Lucía López Corral<sup>2</sup>, Alberto Álvarez Delgado<sup>1</sup>, Teresa Flores Corral<sup>3</sup>, Fernando Geijo Martínez<sup>1</sup>, Dolores Caballero Barrigón<sup>2</sup>, Antonio Rodríguez Pérez<sup>1</sup>.

**Afiliación:** <sup>1</sup>Servicio de Aparato Digestivo; <sup>2</sup>Hematología; y <sup>3</sup>Anatomía Patológica, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

**Referencia:** Rev Esp Enferm Dig. 2012 Jun;104(6):310-314.

**DOI:** 1130-0108/2012/104/6/310-314.

### **ARTÍCULO 3**

**Título:** *POTENTIAL PROTECTIVE EFFECT OF HELICOBACTER PYLORI ON THE DEVELOPMENT OF GASTROINTESTINAL GRAFT VERSUS HOST DISEASE.*

**Autores:** Antonio Velasco -Guardado<sup>1</sup>, Ana Mora-Soler<sup>1</sup>, Lucía López-Corral<sup>2</sup>, Oriana López-Godino<sup>2</sup>, Lourdes Vázquez-López<sup>2</sup>, Oscar Blanco-Muñoz<sup>3</sup>, Estefanía Pérez-López<sup>2</sup>, Antonio Rodríguez-Pérez<sup>1</sup>, Dolores Caballero-Barrigón<sup>2</sup>.

**Afiliación:** <sup>1</sup>Servicio de Aparato Digestivo, <sup>2</sup>Hematología y <sup>3</sup>Anatomía Patológica, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

**Referencia:** En proceso de publicación.



La Prof<sup>a</sup>. Dra. Doña M. Dolores Caballero Barrigón, el Prof. Dr. Antonio Rodríguez Pérez y la Dra. Doña Lucía López Corral,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “FACTORES DIAGNÓSTICOS ENDOSCÓPICOS Y PRONÓSTICOS RELACIONADOS CON EL HELICOBACTER PYLORI EN LA ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUESPED TRAS EL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS”, que presenta el licenciado en Medicina y Cirugía Don Antonio Velasco Guardado ha sido realizado bajo nuestra dirección en los Departamentos de Hematología y Digestivo y reúne, a nuestro juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado en la modalidad de tesis por compendio de publicaciones ante el Tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Salamanca a 30 de Marzo de 2015.

Fdo: Dra. M. Dolores Caballero Barrigón

Fdo: Dr. Antonio Rodríguez Pérez

Fdo: Dra. Lucía López Corral



*Dedicado a las mujeres que amo, Daniela y Martina, y en especial a Eva, que todo me da y todo lo llena.*





## Agradecimientos:

En primer lugar quisiera dar mi agradecimiento a todos aquellos que han estado a mi lado y me han motivado y animado a continuar hasta la consecución de este trabajo.

Al Dr. D. Antonio Rodríguez Pérez, director de esta Tesis, por su apoyo, sus continuos ánimos y su comprensión que me han permitido finalizar con éxito cada uno de los retos que me he propuesto.

A la Dra. Dolores Caballero Barrigón, directora de esta Tesis, por su dedicación y sus sabios consejos, su meticulosidad y su continua motivación que han despertado en mí cierto amor por la Hematología y sus complejos mecanismos.

Al Servicio de Aparato Digestivo en completo, enfermería, auxiliares y facultativos, por su trabajo y su paciencia a la hora de asumir pacientes del estudio y realizar exploraciones según el protocolo, independientemente de la hora y el día, siempre con alegría y disposición.

Al Servicio de Hematología en especial a la Unidad de Trasplante por su dedicación y disposición y más concretamente a las enfermeras de la consulta de trasplante Manoli y Marta por su trabajo, sin el cual no hubiese podido concluir este proyecto.

Al Dr. Oscar Blanco Muñoz y a la Dra. Teresa Flores Corral del Servicio de Anatomía Patológica por su disposición y su incansable trabajo analizando muestras.

Al Dr. D. Guillermo Ternavasio de la Vega, por su ayuda y consejos con el análisis estadístico.

Al Dr. Profesor D. George B. McDonald ya que fue él quien me motivó y me sugirió esta línea de investigación.

A toda mi familia, en especial a mis padres y hermanas, por estar siempre ahí y haber participado en lo que soy.

A Benigno por todo el cariño y apoyo que me ha dado.

Por último quisiera agradecer la consecución de esta Tesis de una manera especial a Juani, que ha sabido llenar el hueco y el tiempo que he dedicado a este trabajo y mimar y cuidar lo que más quiero, como si fuera yo mismo.



«Nada es veneno, todo es veneno: la diferencia está en la dosis»  
PARACELSO



## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. PATOGENIA DE LA EICH.....	5
1.2. ETIOPATOGENIA DE LA EICH.....	6
1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA EICH.....	8
1.3.1. Aguda.....	8
1.3.2. Crónica.....	12
1.4. DIAGNÓSTICO DE LA EICH.....	14
1.4.1. Métodos diagnósticos endoscópicos de la EICH cuando afecta al tracto intestinal.....	15
1.4.1.1. Clasificaciones endoscópicas-histológicas.....	15
1.4.1.2. Correlación clínica-histología-endoscopia.....	18
1.4.1.3. Dónde biopsiar.....	19
1.4.1.4. Nuevas técnicas endoscópicas.....	20
1.4.1.4.1. Imagen de banda estrecha.....	23
1.4.1.4.2. Ultrasonografía endoscópica.....	25
1.4.2. Complicaciones del estudio endoscópico en la EICH.....	26
1.4.3. Otras pruebas de imagen.....	27
1.5. EICH E INFECCIONES GASTROINTESTINALES.....	28
1.5.1. EICH y <i>Helicobacter pylori</i> .....	30
<b>2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS</b> .....	35
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	39
<b>4. RESULTADOS</b> .....	45
4.1. RELACIÓN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS O EN FASE DE REVISIÓN.....	47
4.1.1. <i>HELICOBACTER PYLORI INFECTION AND GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE</i> .....	47
4.1.2. EVALUACIÓN ENDOSCÓPICA Y HALLAZGOS HISTOLÓGICOS EN LA ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED.....	61
4.1.3. <i>POTENTIAL PROTECTIVE EFFECT OF HELICOBACTER PYLORI ON THE DEVELOPMENT OF GASTROINTESTINAL GRAFT VERSUS HOST DISEASE</i> .....	47
4.2. OTROS RESULTADOS.....	97
4.2.1. Evaluación mediante Imagen de Banda Estrecha (NBI) de los pacientes incluidos en el estudio.....	97
4.2.2. Evaluación mediante ultrasonografía endoscópica de los pacientes del estudio.....	98
4.2.3. Complicaciones de los procedimientos endoscópicos en los pacientes del estudio.....	98
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	99

<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	107
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	111
<b>8. ANEXOS</b> .....	125

## TABLA DE ABREVIATURAS

APC: del inglés “*antigen-presenting cell*” célula presentadora de antígenos.

CE: cápsula endoscópica.

DDS: del inglés “*dextran sulphate sodium*” Sulfato sódico de dextrano.

EICH: enfermedad injerto contra huésped.

ELISA: del inglés “*enzyme linked immunoasorbant assay*” análisis por inmunoadsorción con enzimas ligados.

GI: gastrointestinal.

HLA: del inglés “*human leukocyte antigen*” antígeno leucocitario humano.

HP: *Helicobacter pylori*.

IC: Intervalo de confianza.

IL: Interleucina.

IR: Intensidad Reducida.

MRT: Mortalidad relacionada con el trasplante.

NBI: del inglés “*narrow band imagen*” imagen de banda estrecha.

NK: del inglés “*natural killer*” asesina natural.

OR: *odds ratio*.

PAAF: punción aspiración con aguja fina.

RR: Riesgo relativo.

TACH: Trasplante alogénico de células hematopoyéticas.

TC: Tomografía computerizada.

TNF: del inglés “*tumoral necrosis factor*” factor de necrosis tumoral.

USE: Ultrasonografía endoscópica.

VPP: Valor predictivo positivo.

VPN: Valor predictivo negativo.





**INTRODUCCIÓN**





## 1. INTRODUCCIÓN

El trasplante hemopoyético es un procedimiento médico altamente especializado y complejo. Dentro del trasplante hematopoyético hablamos de dos modalidades: Autólogo, en el que las células progenitoras infundidas son las del propio enfermo; este procedimiento permite la administración de altas dosis de quimioterapia evitando la aplasia prolongada. La otra modalidad es el trasplante Alogénico en el que las células progenitoras infundidas son de un sujeto HLA compatible, ya sea un hermano (trasplante alogénico de donante emparentado) o un donante voluntario identificado a través del registro nacional o internacional (trasplante alogénico de donante no emparentado).

Es el tratamiento de elección en pacientes con enfermedades malignas y no malignas; congénitas y adquiridas del sistema hematopoyético. Durante las últimas décadas el trasplante hematopoyético ha evolucionado desde un procedimiento experimental hasta convertirse en el tratamiento estándar de muchas enfermedades neoplásicas como leucemias, síndromes mielodisplásicos, linfomas, mieloma múltiple y otras hereditarias, inmunes o genéticas como talasemias, anemia aplásica, enzimopatías, etc. En los últimos años la mortalidad relacionada con el trasplante (MRT), que sigue siendo la primera causa de fracaso de este procedimiento después de la recaída, se ha reducido gracias al mejor tratamiento de soporte, con mejor control de las infecciones y de la Enfermedad Injerto contra Huésped (EICH), así como al uso de regímenes de acondicionamiento de Intensidad Reducida (IR), lo que ha permitido además ofrecer el trasplante a pacientes mayores de 60 años. Sin embargo, la EICH y las recaídas por fracaso del efecto injerto contra leucemia siguen siendo un reto en el trasplante; el mejor conocimiento de los mecanismos biológicos de la EICH y de la célula neoplásica hará

que en los próximos años el trasplante se realice de una forma más individualizada y eficaz (1; 2).

Dado que la edad media de los pacientes en la mayoría de las enfermedades potencialmente curables con trasplante alogénico es superior a los 60 años, esta estrategia no está accesible a la mayoría de los enfermos con hemopatías malignas. Esto, unido a la demostración de la existencia de un efecto beneficioso del trasplante no asociado a la quimio-radioterapia, sino a las células del donante, efecto al que llamamos de Injerto Contra Leucemia, sugerido tras la observación de remisiones completas moleculares tras infusión de linfocitos del donante en pacientes con leucemia mieloide crónica que recaían tras trasplante alogénico, hizo que varios centros comenzaran a investigar la utilización de regímenes no mieloablativos o de IR, en un intento de ampliar este tratamiento a pacientes de edad superior a 50-55 años o con comorbilidades que lo contraindicaban por un riesgo inaceptable de MRT. Los estudios experimentales en modelos de cerdo y perro realizados por los equipos de Boston y Seattle indicaron que un acondicionamiento no mieloablativo seguido de una inmunosupresión adecuada permitía un injerto mixto estable con una EICH manejable (3; 4). Las mejoras en la profilaxis infecciosa, los nuevos tratamientos inmunosupresores y los avances en el mejor tipaje HLA, han disminuido el número de complicaciones post-trasplante y la MRT (5) pero la EICH sigue siendo la causa principal de morbilidad y mortalidad asociada al procedimiento (3). La incorporación de más de 25 millones de donantes potenciales al registro mundial de donantes de médula ósea junto al aumento en la edad en los pacientes candidatos a trasplante (más de 60 años) y al uso creciente de donantes haploidénticos hace que este procedimiento esté aumentando, incrementándose de este modo el número de pacientes que presentarán EICH (5; 6).

## 1.1. PATOGENIA DE LA EICH

La EICH es el resultado de la agresión inmunológica por parte de las células linfoides infundidas contra los órganos del huésped y continúa siendo una de las complicaciones más importantes del trasplante. Hace 50 años, Billingham formuló tres requisitos para el desarrollo de EICH: El injerto debe contener células inmunológicamente competentes; el receptor debe expresar antígenos tisulares que no estén presentes en el donante y, finalmente, el receptor debe ser incapaz de provocar una respuesta efectiva que elimine las células trasplantadas (7). Las células inmunológicamente competentes son las células T por lo cual la EICH puede desarrollarse en diferentes escenarios clínicos cuando los tejidos que se transfieren de una persona a otra contienen células T (derivados sanguíneos, médula ósea y órganos) y el receptor que no es capaz de eliminar dichas células (7; 8). Los pacientes con un sistema inmune deprimido y que reciben células de la serie blanca de otro individuo, presentan alto riesgo de desarrollar EICH. Los antígenos tisulares a los que hacía referencia Billingham, que no están presentes en el donante y sí en el huésped, son los Antígenos Leucocitarios Humanos o más conocidos según las siglas en inglés HLA. Las células T del donante actúan contra los HLA del receptor provocando la EICH (3; 9). La familia de genes responsable de la codificación de proteínas del sistema HLA (A,B,C y DR) se encuentran en una pequeña región del cromosoma 6 y se heredan generalmente en bloque como un “haplotipo” único; así habrá sólo 4 combinaciones posibles (dos del padre y dos de la madre). Entre dos hermanos, la posibilidad de que dichos haplotipos sean iguales, un haplotipo idéntico (haploidéntico) o distintos los dos será del 25%, 50% y 25% respectivamente. El padre o la madre y los hijos en general compartirán un haplotipo (haploidéntico), a no ser que padre y madre tengan haplotipos iguales o parecidos. Dado que las parejas tienen uno o dos hijos, la posibilidad de un hermano HLA idéntico será no superior al

30%. La posibilidad de tener un donante haploidéntico es mucho mayor, pero este trasplante todavía no es rutinario y se considera “trasplante de fuente alternativa”. El éxito del trasplante será mayor cuanto mayor sea la identidad entre donante y receptor. Por ello, una vez establecida la indicación de trasplante, se realizará el tipaje HLA a los hermanos y se buscará un hermano que sea “HLA idéntico”, es decir, que comparta los dos haplotipos con el paciente: los mismos antígenos de clase I (A,B y C) y de clase II (DR). La mayoría de los trasplantes de hermano se realizan a partir de donantes HLA idénticos (8/8). Si el paciente no tiene donante HLA idéntico entre sus hermanos se iniciará la búsqueda de un donante no emparentado (10; 11). Respecto al trasplante de donante no emparentado se intentará también que tenga una identidad máxima (lo ideal es un donante 8/8 o mejor 10/10, considerando también los antígenos DP y DQ). Para ello se recurrirá a los registros creados a tal efecto en España a través del REDMO (Registro Español de Donantes de Médula Ósea) (12-14).

## **1.2. ETIOPATOGENIA DE LA EICH**

La característica fisiopatológica de la EICH es la apoptosis en el tejido afecto (piel, hígado, tracto gastrointestinal). La EICH aguda se describe como una “tormenta de citocinas”. Ferrara y Deeg la dividen en tres fases (15):

- 1) **Fase pre-trasplante e inflamación asociada al acondicionamiento:** la radiación y la quimioterapia utilizada para el acondicionamiento altera la integridad de la mucosa gastrointestinal; esto va a dar lugar a una transferencia de moléculas como lipopolisacáridos bacterianos y otras partículas patógenas o dañinas (de las siglas en inglés DAMPS/PAMS) provenientes de la microbiota que pasaran a la circulación sistémica (16; 17). Estas moléculas activan el factor

de necrosis tumoral (TNF) y las interleucinas (IL) proinflamatorias 1 y 6 (16; 18; 19) y por consiguiente las células presentadoras de antígenos (APCs) del receptor y las células T del donante que podrían a su vez producir más mediadores inflamatorios (TNF, IL 6) (20) (figura 1).

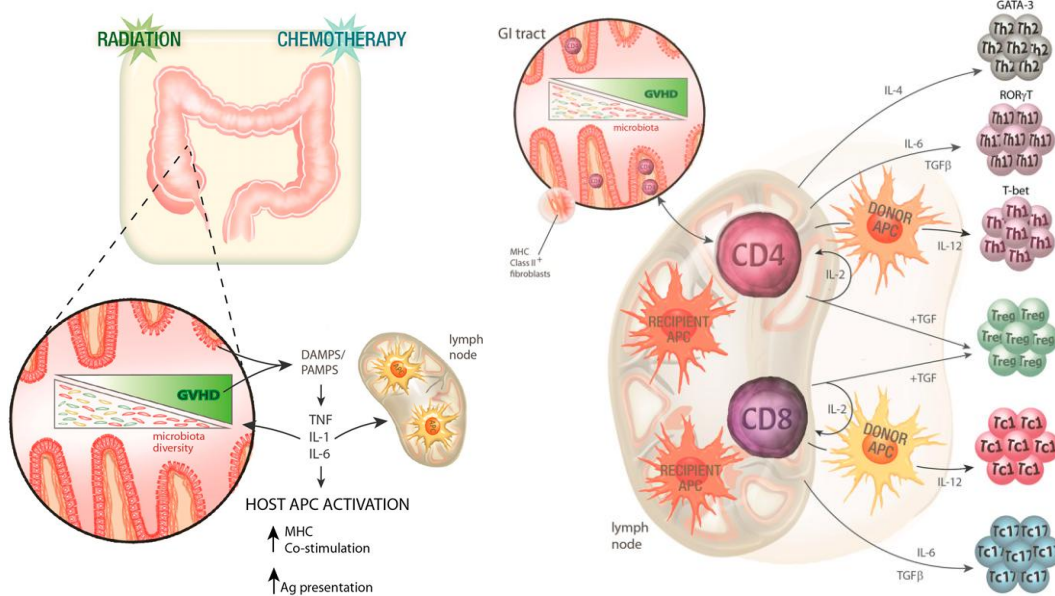


Figura 1: Fases del desarrollo de la EICH aguda. Izquierda: Fase pretransplante e inflamación asociada al acondicionamiento. Derecha: La adaptación de las células T del donante y su diferenciación. De Markey KA et al (21).

2) **La adaptación de las células T del donante y su diferenciación:** este proceso requiere la interacción de la célula T del donante con el complejo menor de histocompatibilidad de una APC. La teoría actual es que las células T CD8 del donante son activadas predominantemente por las APCs hematopoyéticas mientras que las células T CD4 serían activadas por APCs no hematopoyéticas y que esto sucede dentro del tracto gastrointestinal (22; 23). Las APCs del donante también podrían contribuir al desarrollo de la EICH una vez que estén activadas (24). Además hay que tener en cuenta también que las células APC del receptor no necesariamente participan en el inicio de la EICH e incluso pueden regular la posterior expansión de las células T del donante (25) (figura 1).

3) **Apoptosis tisular mediada por citocinas inflamatorias y células T y NK:** el efecto acumulativo del acondicionamiento y la inflamación, el posterior desarrollo de presentación de aloantígenos, y la activación y diferenciación de las células T, conduce a una respuesta inmune en la que citocinas inflamatorias y citolíticas ya sean antígeno-dependientes o independientes de las células T y NK producen la muerte celular en los tejidos diana (Figura 2) (26) y el consecuente desarrollo de la EICH aguda.

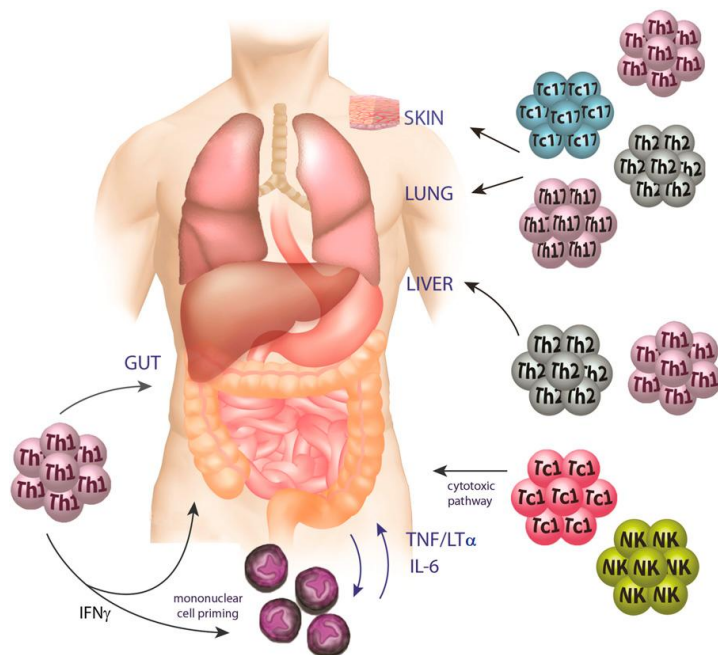


Figura 2: Fases del desarrollo de la EICH aguda. Tercera fase: Apoptosis tisular mediada por citocinas inflamatorias y células T y NK. De Markey KA et al (21).

### 1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA EICH

#### 1.3.1. EICH AGUDA

En los años noventa, el grupo de Seattle definió la EICH aguda como aquella que ocurre en los 100 primeros días post-trasplante, mientras que la EICH crónica aparece a partir de los 100 días (27; 28). Esta definición tenía ciertas limitaciones, por lo que una clasificación más reciente del *National Institutes of Health*, aporta nuevas definiciones



como la EICH aguda de inicio tardío (después de los 100 días) y el síndrome de solapamiento con características tanto agudas como crónicas (28; 29). Ambas situaciones aparecen con mayor frecuencia después del acondicionamiento de intensidad reducida. Aproximadamente el 30-70% de los pacientes desarrollan EICH aguda y en un 20-30% de esos pacientes la mortalidad estará en relación con la misma. La incidencia depende de múltiples factores de riesgo (tabla 1) como la intensidad del régimen de acondicionamiento, tipo de trasplante, edad de paciente y donante, disparidad de sexo, siendo el factor más importante la disparidad HLA de manera que la incidencia se relaciona directamente con el grado de incompatibilidad entre los antígenos HLA y varía desde un 35-45% en receptores de injerto procedente de hermano 100% compatible (10; 11; 30) hasta un 60-80% en receptores de injerto de donante con un antígeno HLA incompatible (31-33). Utilizando el trasplante a partir de cordón umbilical el impacto del grado de incompatibilidad del HLA es menor y este tipo de trasplante ocasiona menos incidencia de EICH (35-65%) (12).

Tabla 1: Factores de riesgo de desarrollo de EICH aguda.

FACTOR	MAYOR RIESGO DE EICH SI:
<b>Compatibilidad donante/receptor</b>	Diferencias HLA o donante no emparentado
<b>Alo-sensibilización donantes</b>	Mujeres con embarazos previos o transfusiones
<b>Edad del paciente y del donante</b>	Mayor edad
<b>Relación sexo donante/receptor</b>	Donante mujer con receptor varón
<b>Régimen acondicionamiento</b>	Mayor intensidad (concepto clásico)
<b>Tipo de progenitores</b>	Sangre periférica
<b>Cantidad de linfocitos T del inóculo</b>	Sin DLT > depleción parcial > depleción total
<b>Si selección positiva CD34+</b>	Mayor celularidad CD34+
<b>Tipo de profilaxis de EICH</b>	No profilaxis > CSA o MTX > CSA+MTX > DLT
<b>Grado cumplimiento profilaxis</b>	No administración de las dosis previstas
<b>Medidas de aislamiento</b>	Aislamiento LAF (sólo demostrado en AM)
<b>Serología CMV</b>	Receptor negativo / Donante positivo

Las manifestaciones clínicas de la EICH pueden aparecer en la piel, el tracto gastrointestinal o el hígado (27; 34):

a) Piel: A menudo la primera manifestación de la EICH aguda es un rash pruriginoso o doloroso, maculopapuloso, que aparece entre la segunda y la quinta semana post-infusión, generalmente coincidiendo con el injerto leucocitario; comienza con eritema en base del cuello, orejas, hombros, palmas y plantas, cara interna de muslos, tronco y flancos, recordando a una quemadura solar. La necrosis epidérmica es la forma más grave con formación de bullas y separación epidérmica similar a la que se observa en la epidermiolisis tóxica. No es infrecuente que se asocie a afectación mucosa.

b) Hígado: Es infrecuente en ausencia de afectación cutánea. Es característica la ictericia con incremento de bilirrubina conjugada y fosfatasa alcalina, reflejo del daño a nivel de los canalículos biliares. Suele observarse también un incremento de transaminasas, aunque pueden permanecer en niveles normales. El diagnóstico diferencial incluye: síndrome de obstrucción sinusoidal, infección (generalmente por virus), sepsis y toxicidad por fármacos (azoles, metotrexate (MTX), inmunosupresores). Es infrecuente el fallo hepático debido únicamente a EICH aguda y así, la presencia de hipoalbuminemia debe hacer sospechar afectación del tubo digestivo o balance nitrogenado negativo más que insuficiencia hepática.

c) Intestinal: La afectación intestinal es habitualmente la más grave y difícil de tratar.

Las manifestaciones clínicas incluyen: anorexia, náuseas, vómitos e intolerancia alimentaria (forma proximal), diarrea, dolor abdominal de tipo cólico y en casos graves, hemorragia e íleo paralítico (forma distal). En cuanto a las características organolépticas de la deposición, ésta suele ser verdosa (tránsito acelerado), pudiendo presentar mucosidad y células de descamación. El diagnóstico diferencial incluye: toxicidad gastrointestinal inducida por el régimen de acondicionamiento o infecciones, por lo que

es necesario realizar estudios microbiológicos seriados (norovirus, adenovirus, rotavirus, toxina B de clostridium difficile, bacterias y hongos). En este sentido debe tenerse en cuenta que las infecciones que con más frecuencia pueden remedar una EICH son CMV, adenovirus, rotavirus, astrovirus, norovirus, cryptosporidium, micobacterias y clostridium difficile. La toxicidad por MMF y la microangiopatía trombótica intestinal pueden también confundirse con EICH.

d) Signos y síntomas concomitantes: Fiebre, pérdida de peso, deterioro del estado general. También las mucosas, las glándulas exocrinas y bronquios pueden verse afectados (no incluidos en la gradación clínica).

La gravedad de la EICH se determina según la extensión de la afectación de dichos órganos. Se clasifica en grado I (leve), grado II (moderado), III (grave) y IV (muy grave) y se resumen en la tabla 2 (1). Los grados III y IV tienen un mal pronóstico con una supervivencia a los 5 años del 25% para el grado III y menor del 5% para el grado IV (30).

Tabla 2: Graduación clínica de la EICH según el órgano afecto y global (1).

❖ GRADO DE AFECCIÓN POR ÓRGANOS						
Órgano	Grado	Características				
Piel	+	Eritema maculopapuloso en < 25% superficie corporal <sup>1</sup>				
	++	Eritema maculopapuloso en 25-50% superficie corporal				
	+++	Eritrodermia generalizada				
	++++	Eritrodermia generalizada con vesículas y descamación				
Hígado	+	Bilirrubina entre 2 y 3 mg/dL				
	++	Bilirrubina entre 3,1 y 6 mg/dL				
	+++	Bilirrubina entre 6,1 y 15 mg/dL				
	++++	Bilirrubina >15 mg/dL				
Intestino	+	Diarrea 500 - 1000 mL/día <sup>2</sup>				
	++	Diarrea 1000 - 1500 mL/día				
	+++	Diarrea >1500 mL/día				
	++++	Dolor abdominal intenso con o sin íleo intestinal				

1.- Cálculo de extensión empleando la regla de los nueves: cabeza 9%; brazos 18% (9% cada uno con 4,5% para cara anterior y 4,5% para posterior); Torso 36% (9% tórax anterior, 9% posterior, 9% abdomen anterior y 9% posterior); Piernas 18% (con 4,5% en cada sección -superior, inferior, anterior, posterior). Una forma fácil de calcular la extensión es recordar que la palma de la mano representa un 1% de la superficie corporal.

❖ GRADACIÓN CLÍNICA						
Grado	Piel	Hígado	Intestino	AEG		
Grado I	+ / ++	0	0	0		
Grado II	+ / ++ / +++	+	y/o	+		
(1)	+++ aislada		o	+ por biopsia		
Grado III	++ / +++	y	++ / +++	++ / +++		
Grado IV	++ / +++ / ++++	y	++ / +++ / ++++	++ / +++ / ++++		

AEG= afectación del estado general (1) Modificación de la clasificación inicial que pretende valorar la afectación aislada de intestino o piel.

### 1.3.2. EICH CRÓNICA

La EICH crónica es la causa de muerte tardía más frecuente después de la recaída de la enfermedad tras el trasplante alogénico de células hematopoyéticas (TACH) (35). La presentación puede ser progresiva (evolucionando de aguda a crónica), quiescente (EICH aguda resuelta completamente pero que posteriormente desarrolla una forma crónica) o *de novo* sin presentación aguda. Los pacientes que presentan mayor riesgo de desarrollar EICH crónica son aquellos de mayor edad y que han presentado una forma aguda de la enfermedad (36). La utilización de sangre periférica en vez de Médula ósea, la incompatibilidad HLA y el desarrollo de EICH aguda aumentan la incidencia de EICH crónica; determinadas estrategias como el uso de timoglobulina en la profilaxis de la EICH pueden prevenir la aparición de la EICH aguda y de esta forma previenen el desarrollo de la forma crónica.

Tabla 3: Localización de los síntomas en la EICH crónica.

LOCALIZACIÓN	SIGNOS Y SÍNTOMAS
Piel	Despigmentación, alopecia, erupción similar al liquen plano, poiquilodermia, esclerosis.
Uña	Distrofia.
Boca	Xerostomía, úlceras, esclerosis, retracciones, lesiones tipo liquen.
Ojos	Síndrome de Sicca, conjuntivitis cicatricial.
Músculos y articulaciones	Fascitis, miositis, rigidez articular.
Genitales femeninos	Esclerosis vaginal, ulceraciones.
Tracto GI*	Anorexia, pérdida de peso, estenosis esofágicas.
Hígado	Ictericia, hipertransaminemia.
Pulmón	Alteraciones restrictivas u obstructivas en los test de función pulmonar, bronquiolitis obliterante, derrame pleural.
Riñón	Síndrome nefrótico (raro).
Corazón	Pericarditis.
Médula ósea	Trombocitopenia, anemia, neutropenia.

\*gastrointestinal

Las manifestaciones clínicas de la EICH crónica son muy variadas y remedan las que aparecen en las enfermedades autoinmunes (tabla 3). Se ha desarrollado recientemente un nuevo consenso sobre criterios diagnósticos y estadiaje de la EICH crónica (29). El diagnóstico de EICHc se establece ante la presencia de 1 criterio diagnóstico o 1 criterio distintivo + biopsia / test confirmatorio. La realización de biopsia, por tanto, se recomienda siempre, aunque de no ser posible no es mandatoria para establecer el diagnóstico ante la presencia de algún criterio diagnóstico. Una vez establecido el criterio diagnóstico, distintivo, etc, para cada órgano se establece una puntuación en función del grado de afectación según se especifica en la siguiente tabla (29):

Tabla 4: Puntuación asignada a cada órgano para evaluar la severidad de la EICHc

	Puntuación: 0	Puntuación: 1	Puntuación: 2	Puntuación: 3
<b>Estado general</b>	Asintomático ECOG 0 Karnofsky 0	Sintomático; paciente ambulatorio, limitado unicamente con actividad intensa ECOG 1 Karnofsky 1	Sintomático, paciente ambulatorio, capaz de llevar a cabo medidas elementales de higiene personal ECOG 2 Karnofsky 2	Sintomático, capacidad limitada para llevar a cabo medidas de higiene personal ECOG 3 Karnofsky 3
<b>Piel</b>	Asintomático Sin hallazgos a la exploración	<18% SCA pero sin signos de esclerosis	19-50% SCA o lesiones superficiales escleróticas (la rigidez permite "pellizcar" la piel)	> 50% SCA o cambios escleróticos profundos (no se puede "pellizcar" la piel) o alteración de la movilidad ulceraciones o prurito severo
<b>Boca</b>	Asintomático	Sintomatología leve con signos de enfermedad en mucosa pero que no limita la ingesta	Sintomatología moderada con signos de enfermedad en mucosa y limitación parcial de la ingesta oral	Sintomatología severa con signos de enfermedad que limitan la ingesta
<b>Ojos</b>	Asintomático	Síntomas leves de ojo seco que no afectan la AC (requiere gotas oculares $\leq 3$ / día) ó asintomático con signos de QS	Síntomas moderados que afectan parcialmente la AC (gotas $> 3$ / día) sin afectación de agudeza visual	Síntomas severos que afectan la AC ó incapacidad para trabajar debido a la sintomatología ocular ó pérdida de visión causada por QS
<b>Tubo digestivo</b>	Asintomático	Disfagia, anorexia, nauseas, vómitos, dolor abdominal o diarrea sin pérdida significativa de peso ( $< 5\%$ )	Síntomas asociados a pérdida moderada de peso (5-15%)	Síntomas asociados a pérdida de peso $> 15\%$ , requiere aporte nutricional ó dilatación esofágica
<b>Hígado</b>	PFH normales	Alteración PFH $< 2 \times$ LSN	Bilirrubina $> 3$ mg/dL o enzimas hepáticos 2-5 x LSN	PFH $> 5 \times$ LSN
<b>Pulmones</b>	Asintomático  FEV1 $> 80\%$ ó PFP	Síntomas leves (disnea tras subir un piso de escaleras) FEV1 60-79% ó PFP 3-5	Síntomas moderados (disnea tras caminar en llano) FEV1 40-59% ó PFP 6-9	Síntomas graves (disnea de reposo)  FEV1 $< 39\%$ ó PFP 10-12
<b>Articulaciones y músculos</b>	Asintomático	Tirantez en brazos o piernas, movilidad articular normal o levemente disminuida que no afectan la AC	Tirantez en brazos o piernas o contracturas articulares, eritema debido a fascitis, movilidad articular afectada moderadamente que limita la AC de manera leve o	Contracturas con afectación severa de la movilidad articular que afecta severamente la AC (incapaz de atarse los zapatos, vestirse, etc)

<b>Tracto genitourinario</b>	Asintomático	Sintomático con signos de afectación leve que no afectan el coito; mínimas molestias a la exploración ginecológica	moderada	Sintomático con signos de afectación a la exploración con leve o molestias a la exploración	Sintomático con signos severos de afectación (estenosis, ulceración) con dispareunia o imposibilidad de introducir un espéculo

SCA: superficie corporal afectada; AC: actividades cotidianas; PFH: pruebas de función hepática (bilirrubina, fosfatasa alcalina, transaminasas); QS: queratoconjuntivitis seca; LSN: límite superior de la normalidad; PFP: pruebas de función pulmonar (al FEV1 y DLCO se les asigna un valor de acuerdo al siguiente criterio: > 80% = 1; 70-79% = 2; 60-69% = 3; 50-59% = 4; 40-49% = 5; < 40% = 6)

#### 1.4. DIANÓSTICO DE LA EICH

El diagnóstico de certeza de EICH se basa en el estudio histológico del órgano afectado. Las distintas estrategias encaminadas a su profilaxis son insuficientes y tampoco hoy es posible determinar qué pacientes desarrollaran una EICH o no y cuál será la gravedad por lo que muchos grupos a nivel internacional trabajan en la definición y búsqueda de un marcador biológico que permitan establecer un diagnóstico precoz, adecuando la profilaxis al riesgo de su desarrollo (37; 38).

La EICH es una complicación grave del TACH, con elevada mortalidad, en especial cuando es refractaria a la primera línea de tratamiento, situación que aumenta claramente la mortalidad.

En el diagnóstico de la EICH intestinal no existen patrones endoscópicos patognomónicos, además de que el número de estudios reportados es escaso. No disponemos de criterios definitivos del diagnóstico macroscópico endoscópico ni de la correlación de estos hallazgos con la histología y la gravedad. Con el desarrollo de nuevas técnicas endoscópicas que mejoran el análisis visual de la mucosa (Narrow Band Imaging (NBI), endomicroscopía, cápsula endoscópica...) varios grupos de investigadores y clínicos están intentado valorar su utilidad en el diagnóstico de esta complicación post-trasplante. El objetivo de las mismas es definir si es necesario hacer

biopsia, cómo hacerla y dónde en los pacientes que comienzan con síntomas gastrointestinales. Por otra parte, a menudo los pacientes están trombopénicos, por lo que no debe olvidarse el potencial riesgo de sangrado. Parece pues lógico investigar si los sistemas ópticos de que se dispone en la actualidad pueden hacer el diagnóstico de manera fiable y precoz, evitando la biopsia y sus potenciales complicaciones, además de adelantar el diagnóstico, lo que permitiría el inicio precoz del tratamiento.

#### **1.4.1. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS ENDOSCÓPICOS DE LA EICH CUANDO AFECTA AL TRACTO INTESTINAL.**

##### **1.4.1.1. CLASIFICACIONES ENDOSCÓPICAS-HISTOLÓGICAS**

Los síntomas gastrointestinales como las náuseas, vómitos, diarrea, anorexia, durante los 100 primeros días tras el trasplante de células hematopoyéticas plantean el diagnóstico diferencial entre EICH y otros procesos como toxicidad de la quimioterapia o radioterapia, efectos secundarios medicamentosos, infecciones bacterianas, víricas, parasitarias o fúngicas (39; 40). El estudio endoscópico de estómago y duodeno en la EICH, pueden variar entre mucosa normal y alteraciones como edema, eritema, hasta ulceraciones francas y erosiones mucosas, alteraciones muy inespecíficas y de interpretación a veces muy subjetiva por parte del endoscopista, que hacen difícil un diagnóstico diferencial; aunque varios expertos han publicado índices con esta finalidad, éstos no han sido validados por lo que la simple visión endoscópica hoy no es capaz de determinar pautas seguras de tratamiento y la biopsia continua siendo obligatoria. Cruz-Correa en el año 2002 propuso la siguiente clasificación gradual para los hallazgos endoscópicos (Figura 3) en los pacientes con EICH (41):

- Grado 0: Normal.
- Grado I: Pérdida del patrón vascular y/o eritema focal moderado.
- Grado II. Edema y/o eritema difuso moderado.

- Grado III: Edema, eritema, erosiones y/o sangrado.
- Grado IV: Ulceración, exudados y/o sangrado.

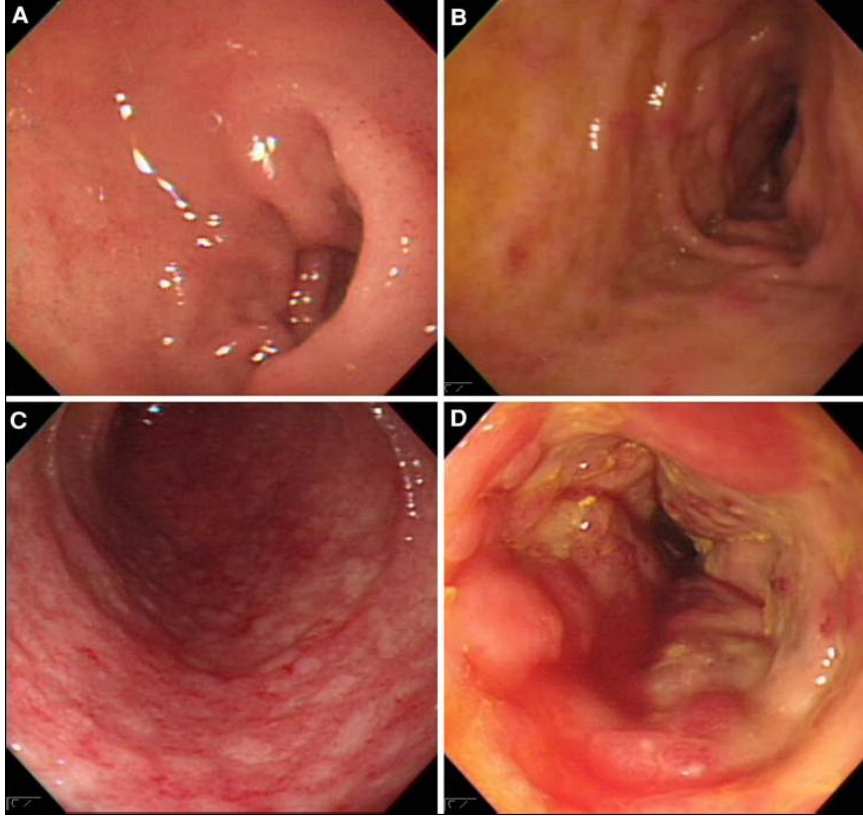


Figura 3: Hallazgos endoscópicos en la EICH. Grados según Cruz-Correa (41): (a) grado I, (b) grado II, (c) grado III y (d) grado IV. Procedente de Cheung y cols (42).

Los hallazgos histológicos, independientemente de la zona biopsiada, incluyen apoptosis celular de las criptas epiteliales, destrucción de criptas, infiltración variable de linfocitos en el epitelio y la lámina propia (39; 43). En un estudio retrospectivo dónde se realizó gastroscopia y biopsia en pacientes con EICH, no encontraron diferencias con respecto a los hallazgos endoscópicos o los síntomas entre los pacientes que posteriormente se diagnosticaron de EICH gastrointestinal y los que no. En este estudio, el 18% de los pacientes con histología compatible con EICH presentaban una endoscopia normal (44). Dados los hallazgos endoscópicos y los síntomas inespecíficos de los pacientes y teniendo en cuenta los efectos secundarios significativos de los



inmunosupresores usados para el tratamiento de la EICH, es recomendable una confirmación histológica antes de iniciar el tratamiento (44; 45). McDonald y Sales(4) en el año 1984 propusieron una clasificación de la histología en diversos grados (independientemente de la localización de la biopsia) (Figura 4):

- Grado 0: Normal.
- Grado I: Necrosis celular (apoptosis) de intensidad media sin pérdida de criptas.
- Grado II: Pérdida de una cripta aislada, abscesos crípticos glandulares, dilatación de las criptas glandulares, aplanamiento epitelial.
- Grado III: Pérdida de dos o más criptas glandulares contiguas.
- Grado IV: Descamación completa del epitelio.

Esta clasificación histológica ha sido recientemente modificada por Washington et al (2) con mínimos cambios.

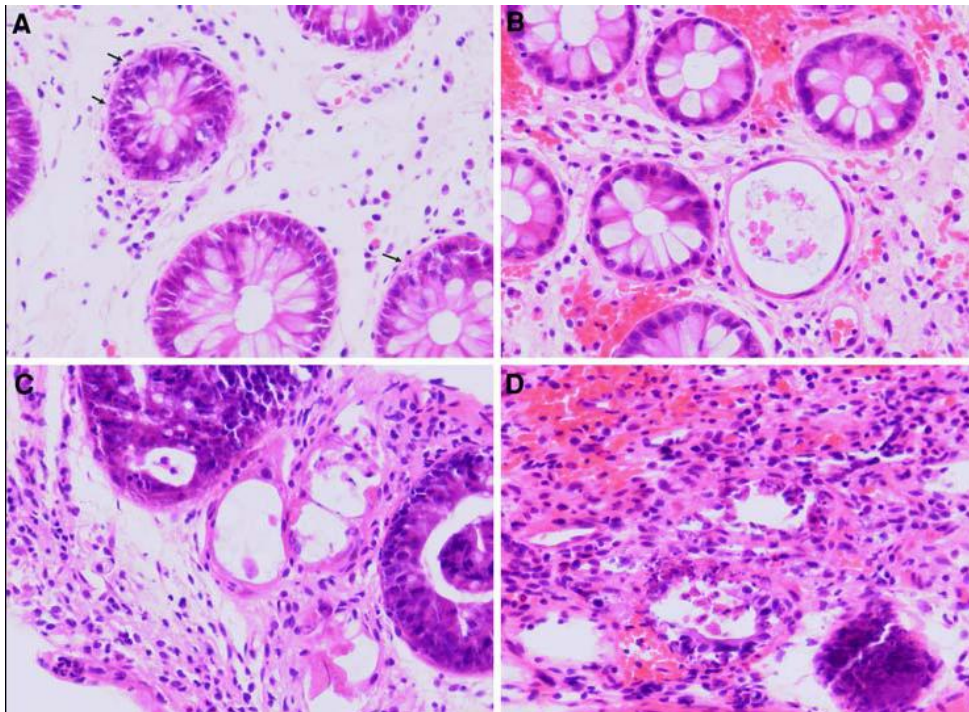


Figura 4: Hallazgos histológicos según la clasificación de Mcdonald y Sales (4) en los pacientes con EICH: (a) grado I, (b) grado II, (c) grado III y (d) grado IV. Procedente de Cheung y cols (42).

#### **1.4.1.2 CORRELACIÓN CLÍNICA-HISTOLOGÍA-ENDOSCOPIA**

En la mayoría de los centros, entre el 15% y el 30% de los pacientes con TACH son remitidos a la Unidad de Endoscopias con el objeto de confirmar el diagnóstico de EICH(42; 46; 47). A pesar de que es necesaria confirmación histológica para establecer el diagnóstico, algunos centros, valoran la interpretación macroscópica como esencial de cara a iniciar el tratamiento a ser posible el día de realización de la endoscopia.

Un estudio japonés, realizó biopsias de manera rutinaria entre los días 20 y 50 post-trasplante en 44 pacientes. Encontraron biopsias compatibles con EICH en el 42% (n=5) de los pacientes asintomáticos, de los cuales, 2 presentaban EICH cutáneo, uno desarrolló EICH crónico y dos no desarrollaron EICH. El significado de este EICH gastrointestinal subclínico es incierto (48).

En 1994 Kreisel y cols, realizaron un estudio en el que compararon la graduación histológica con la graduación endoscópica (macroscópica) en la EICH aguda y encontraron una buena correlación con una diferencia gradual entre 0 y 1 en el 87,6% de las endoscopias (49). Sin embargo, otro estudio más reciente encontró una diferencia de 2 a 4 grados en el 28,2% de las biopsias con respecto a la valoración endoscópica. En este estudio, se realizó un diagnóstico histológico de EICH aguda en un 44,7% de biopsias de áreas endoscópicamente normales, resaltando la necesidad de realizar biopsias en áreas de mucosa aparentemente normal cuando se sospeche la presencia de EICH. Los autores no consideran útil el grado histopatológico para valorar la gravedad de la EICH en los pacientes con TACH; considerando los criterios de gravedad clínicos como los factores predictivos de respuesta y mortalidad (47). Otro estudio reciente con 27 pacientes con EICH (a partir de biopsias de colon), observa que los grados histológicos III y IV (con una pérdida de criptas mayor) en comparación con los grados I y II, no solo presentan una clínica más intensa ( $p=0,01$ ), sino que requieren

tratamientos de segunda línea por corticorrefractoriedad ( $p=0,027$ ) y presentan una mayor mortalidad asociada a complicaciones de la EICH ( $p=0,05$ ) (50).

#### *1.4.1.3 DÓNDE BIOPSIAR*

Existen discrepancias entre los distintos estudios sobre cuál es la mejor zona del tracto digestivo y la más rentable para la toma de biopsias en el diagnóstico de EICH gastrointestinal (47). Lo más lógico sería biopsiar la zona según los síntomas predominantes (34). En la década de los 90 varios estudios retrospectivos y observacionales evaluaron los hallazgos de la endoscopia digestiva alta y baja según predominasen las náuseas y vómitos o la diarrea, pero sin hacer ningún análisis comparativo entre las diferentes actitudes (51; 52). La generalización del uso de la endoscopia para evaluar los síntomas gastrointestinales ha supuesto un aumento en la incidencia de EICH gastrointestinal en comparación con registros históricos (53).

Thomson y cols (47) en el año 2006, realizaron un estudio prospectivo con 24 pacientes sometidos a TACH que presentaban diarrea en los primeros 100 días post-trasplante. Realizaron en todos ellos gastroscopia (toma de biopsias gástricas y duodenales), colonoscopia (biopsias de colon izquierdo y derecho) e ileoscopia (biopsia de ileon terminal). La mayor rentabilidad diagnóstica de las biopsias tomadas se situó en colon izquierdo (82%), en comparación con el 77% del colon derecho, el 68% del ileon, 65% en duodeno y el 71% en antro. Al seleccionar aquellos pacientes que presentaban de manera concomitante náuseas y vómitos con diarrea, el colon izquierdo continuaba presentando la mayor rentabilidad (82%). La combinación de colonoscopia con ileoscopia y la colonoscopia más gastroscopia presentaban los porcentajes de biopsias positivas más altos (95% y 94% respectivamente).

En otro estudio prospectivo con 26 pacientes cuya clínica inicial se caracterizaba por diarrea junto a síntomas gastrointestinales altos desde el día 20 al 100 post-trasplante, se realizó gastroscopia y colonoscopia con biopsias. Las biopsias gástricas fueron positivas en el 85% de los casos mientras que las biopsias duodenales y de rectosigma fueron ambas positivas en el 58% (39). Otro estudio retrospectivo incluyendo 77 pacientes analizó los resultados tras gastroscopia y sigmoidoscopia entre el día 20 al 100 post-trasplante (75% tenía anorexia, náuseas o vómitos, el 27% dolor abdominal alto y el 21% diarrea). De los 42 pacientes con biopsia positiva para EICH, el 81% tenía biopsias del tracto gastrointestinal alto positivas y el 67% tenía biopsias rectales positivas (44).

En 2008, Ross y colaboradores realizaron un estudio prospectivo con 112 pacientes a los que se realizó simultáneamente biopsia de estómago, duodeno y colon rectosigmoide para el diagnóstico de EICH gastrointestinal en los primeros 100 días tras el trasplante. Las biopsias tomadas a nivel de rectosigma conseguían unos valores más altos para el diagnóstico de EICH en cuanto a sensibilidad, especificidad, VPP y VPN, en comparación con las demás localizaciones (95,6%, 100%, 100% y 84%, respectivamente). La sensibilidad de las biopsias gástricas y duodenales fueron del 72,5% ( $p < 0,00001$ ) y 79,2% ( $p = 0,0018$ ) respectivamente mientras que el VPN fue del 45,6% para el estómago ( $p = 0,0039$ ) y 52,5% ( $p = 0,02$ ) para el duodeno. Las biopsias de recto-sigma presentaban una sensibilidad y un VPN más alto independientemente de si el paciente presenta náuseas/vómitos o diarrea (40).

#### ***1.4.1.4 NUEVAS TÉCNICAS ENDOSCÓPICAS***

Se han evaluado nuevas técnicas endoscópicas para el diagnóstico de EICH, entre las que destacan la endomicroscopía confocal, la cápsula endoscópica (CE) y el endoscopio de magnificación, aunque todos los estudios publicados presentan un número muy pequeño de pacientes.

Bojarski utilizó la endomicroscopia confocal en 35 pacientes con diarrea aguda post-TACH obteniendo una sensibilidad del 74% y una especificidad del 100% para el diagnóstico de EICH en comparación con la endoscopia convencional (54).

El primer estudio con cápsula endoscópica (CE) se realizó en 2004; se realizaron 10 exploraciones en pacientes con sospecha de EICH (Figura 5) (55). Neuman realizó en 2007 otro pequeño estudio prospectivo simple ciego comparando los hallazgos de la CE con la endoscopia convencional en 14 pacientes. En un paciente la cápsula no progresó de estómago por lo que hubo que extraerla. De los 7 pacientes en los que se confirmó con biopsia la presencia de EICH, 4 (57%) habían sido bien diagnosticados por la endoscopia convencional y 7 (100%) por la cápsula, que pudo evaluar lesiones más distales, especialmente en ileon (56). Más recientemente, Varadarajan realizó un estudio con CE en 11 pacientes con síntomas gastrointestinales tras el trasplante obteniendo que la CE es un método eficaz para evaluar la gravedad de la afectación endoscópica (57).

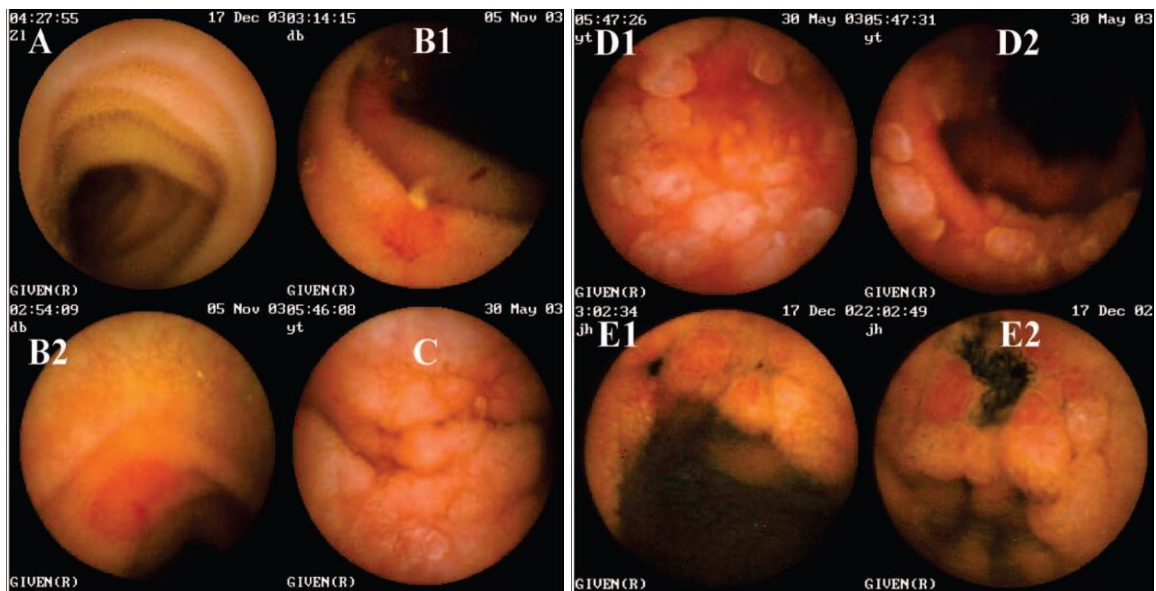


Figura 5: Varios ejemplos de imágenes de cápsula endoscópica. De Yakoub-Agha y cols(55).

Un estudio reciente combina la cápsula endoscópica con la endomicroscopía confocal (figura 6) para detectar lesiones endoscópicas precoces en la EICH. La CE obtiene una



sensibilidad del 50% y una especificidad del 80% mientras que la endomicroscopía confocal alcanza una sensibilidad del 87,5% y una especificidad del 71.5% (58).

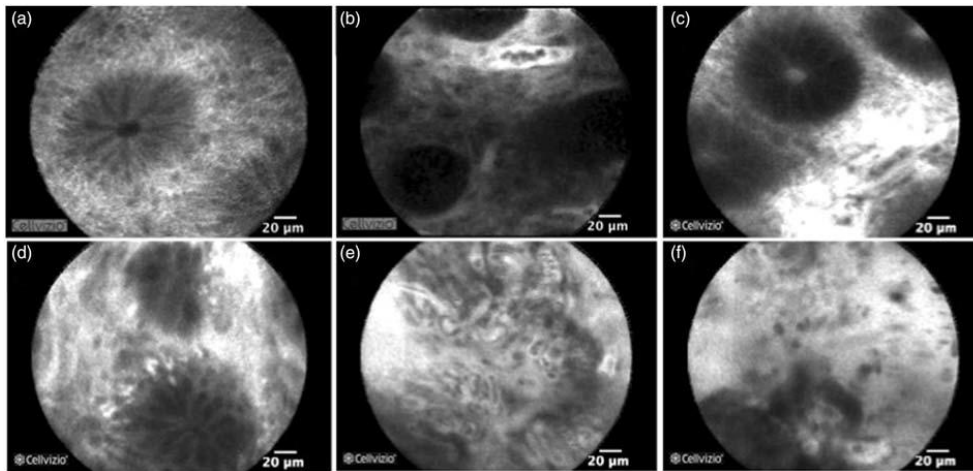


Figura 6: Imágenes de endomicroscopía confocal en el EICH a nivel colónico (58).

En cuanto al endoscopio de magnificación solo se ha publicado un caso clínico descriptivo (Figuras 7 y 8) (59).

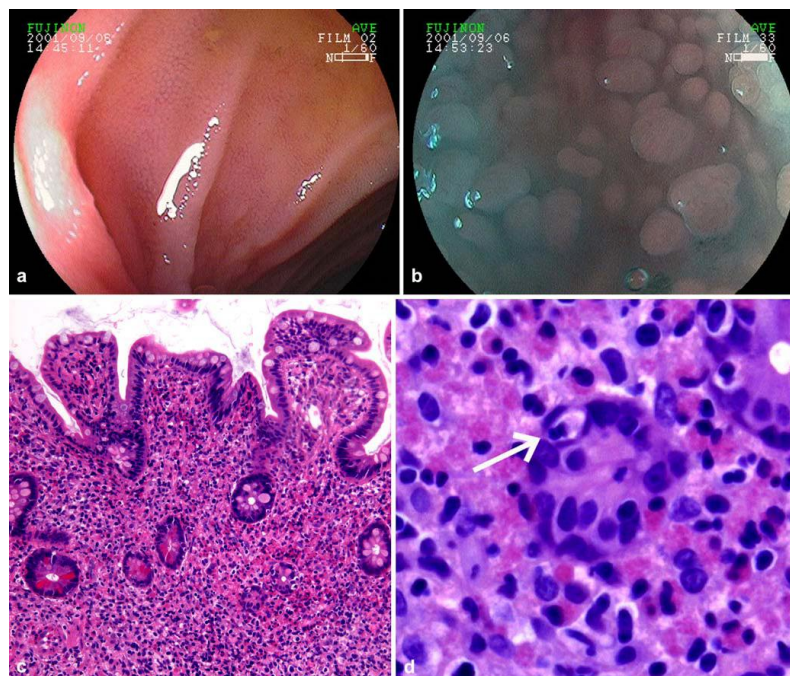


Figura 7: (a) Visión endoscópica de ileon normal. (b) Visión magnificada con morfología anormal de las vellosidades (tinción con índigo carmín). (c) Biopsia con hematosilina y eosina con acortamiento de las vellosidades. (d) Cuerpo apoptótico en un cripta (flecha). De Onozawa y cols (59).

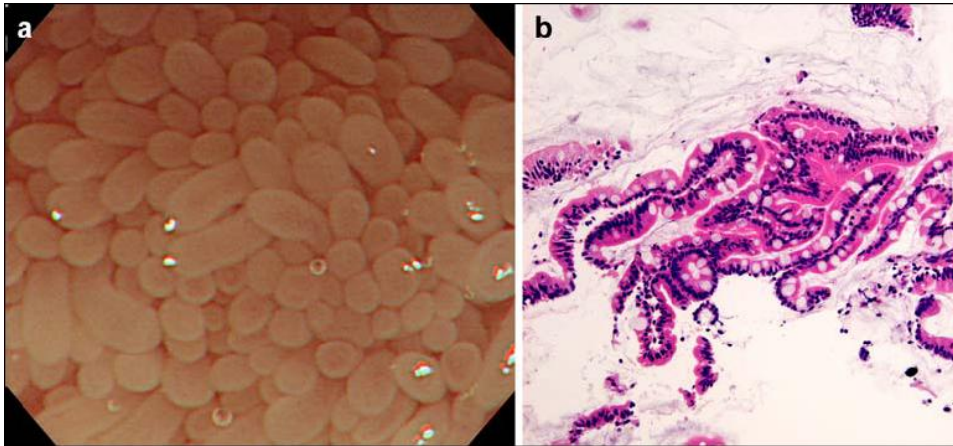


Figura 8: Visión magnificada de las vellosidades de ileon del paciente anterior tras tratamiento (a) y estudio histológico en biopsia (b). De Onozawa y cols (59).

#### 1.4.1.4.1 IMAGEN DE BANDA ESTRECHA (NBI)

En la endoscopia con el sistema NBI se utiliza como fuente de luz una lámpara de xenón que administra una luz blanca que por lo tanto está compuesta por las diferentes longitudes de onda que dan los colores que la componen (púrpura, rojo, amarillo, verde, azul cian, azul oscuro), la luz reflejada del tejido tiene un espectro diferente al de la luz emitida por la fuente, dependiendo de las características del tejido iluminado (inflamatorio, neoplásico, normal, etc.), lo cual es captado por un chip CCD en la punta del equipo y a su vez enviada a un procesador que la reconstruye. La profundidad que logran los fotones en el tejido depende de la longitud de onda del color respectivo, por ejemplo el color más superficial es el azul (415 nm) penetra 0.17 mm que al ser interpretado da información de la superficie mucosa y sus capilares, mientras el que logra mayor profundidad es el rojo (600 nm) penetra 0.28 mm, da información de planos profundos incluso de la submucosa y sus vasos más grandes y profundos, los fotones del color verde (540 nm) penetran 0.24 mm y se ubican en un nivel intermedio entre el azul y el rojo y por lo tanto dan una imagen transicional (figura 9). La hemoglobina es el agente mayormente comprometido en la absorción de la luz visible y es la causante del color rojo de los vasos sanguíneos. En la NBI se utilizan 2 sistemas

para la reconstrucción de las imágenes: El primero consta de un CCD color en el cual los pixeles son selectivamente asignados a rangos específicos de longitud de onda como rojo, verde o azul (R, G, B) o cyan, amarillo, magenta (Cy, M, K), el CCD captura el rango completo de la luz blanca y lo transfiere en un simple paso al procesador con orden de reconstruir el color natural en un monitor de video, este es el sistema no secuencial, en el segundo sistema se coloca un filtro rotatorio de los diferentes colores rojo, verde y azul (sistema secuencial de la reconstrucción de imágenes) que permite el paso de estas longitudes de onda previamente a la llegada de la luz al tejido, lo cual resulta al ser reflejada la luz y captada por el CCD en la punta del equipo, en diferentes imágenes que resaltan o incrementan los contrastes de las estructuras que componen el tejido observado como por ejemplo entre el epitelio y los vasos subyacentes a este. La estructura laminar de la mucosa gastrointestinal incluidas sus alteraciones por inflamación o neoplasia actúan como elementos de dispersión e interfieren con el espectro de reflectancia. La NBI se combina con la magnificación óptica y electrónica permitiendo demostrar la desorganización del patrón vascular en patologías inflamatorias o en la superficie de lesiones neoplásicas o preneoplásicas (60) como el esófago de Barrett (61), la displasia escamosa en el bronquio (62), o el patrón mucoso de los pólipos colónicos (63) y más recientemente en patología benigna inflamatoria, como en la infección por HP (64), la gastritis crónica (65) o atrófica (66).



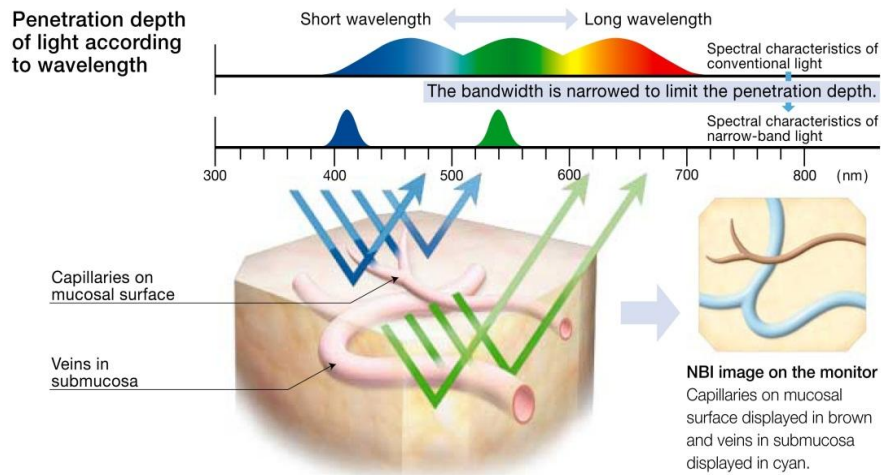


Figura 9: Sistema endoscópico de imagen de banda estrecha (NBI).

#### 1.4.1.4.3 ULTRASONOGRAFÍA ENDOSCÓPICA

La ultrasonografía endoscópica (USE) o ecoendoscopia es una técnica de exploración que une dos procedimientos que en las últimas décadas han aportado un avance espectacular en el campo diagnóstico y terapéutico de las enfermedades que afectan al tracto digestivo: la endoscopia y la ecografía. Utilizada con 7,5 MHz permite visualizar en la pared del tracto digestivo 5 capas (mucosa, muscular mucosa, submucosa, muscular propia y serosa) y permite medir el grosor de la pared (normal hasta 5 mm) y el de las diferentes capas de manera que esta capacidad ha sido utilizada para el diagnóstico de enfermedades como la enfermedad de Ménétrier y el linfoma gástrico (67) (figuras 10 y 11). Avunduk et al estudiaron con USE el engrosamiento de las primeras capas producido por la infección de *Helicobacter pylori*, el cual se normalizaba tras la erradicación (67; 68). Varios autores han estudiado la relación entre el engrosamiento de las capas de la pared gástrica y la malignidad de la enfermedad de base, de manera que el engrosamiento de las primeras capas indicaría benignidad y malignidad si la afectación se extiende a capas más profundas (69; 70). No se ha evaluado la utilidad de la USE en la EICH. Las complicaciones de la USE son similares

a las de la gastroscopia convencional y sobretodo aumentan si se realiza PAAF o procedimientos terapéuticos guiados por USE.

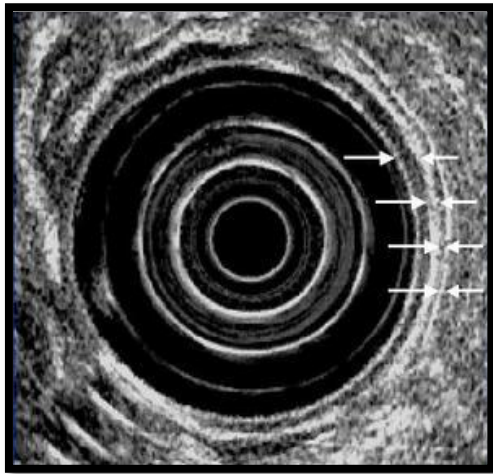


Figura 10: Imagen mediante USE de las capas de la pared gástrica. Por orden de dentro hacia fuera: Mucosa, submucosa, muscular y serosa.

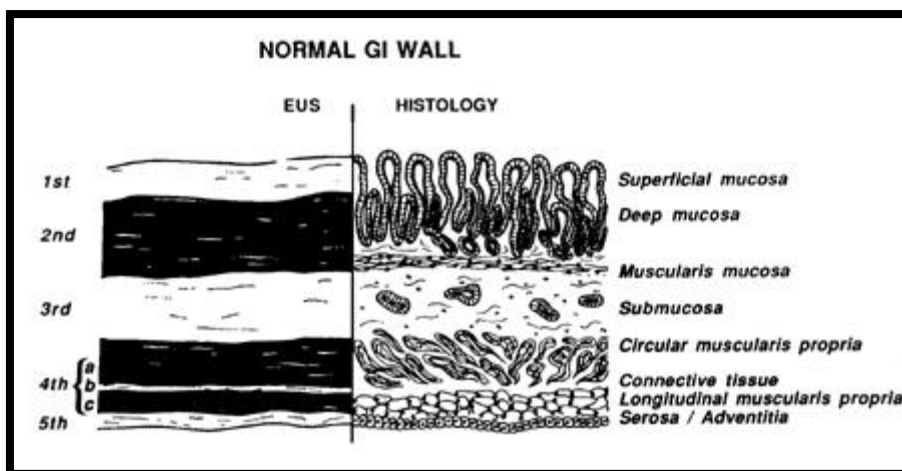


Figura 11: Correlación entre la imagen mediante USE (derecha) e histología (izquierda). De Snady H (71).

#### 1.4.2 COMPLICACIONES DEL ESTUDIO ENDOSCÓPICO EN LA EICH

Se ha descrito hasta un 1,8% de mortalidad asociada a la técnica endoscópica (72). Los pacientes que a menudo presentan neutropenia y trombocitopenia tienen mayor riesgo de sangrado e infección por lo cual algunos hospitales no realizan biopsia hasta que el recuento plaquetario es superior a  $50.000/ \text{mm}^3$  (43). Esto conlleva la necesidad de

transfusión. Otros centros han investigado si un umbral más bajo de recuento plaquetario podría ser igualmente seguro (73). La hemorragia gastrointestinal post-trasplante se ha asociado con una mayor mortalidad y las opciones terapéuticas son limitadas, sobre todo en centros que evitan realizar tratamiento endoscópico (74). Sin embargo, raramente se atribuye el sangrado a la biopsia endoscópica (75). En el estudio pediátrico de Khan, tuvieron un 3,1% de complicaciones, la mayoría fueron sangrados digestivos y más frecuentemente tras biopsias de sigma. La aparición de complicaciones se asociaba a la presencia de trombocitopenia, por debajo de  $50.000/\text{mm}^3$  ( $p < 0,01$ ) (76).

Es difícil evaluar la tasa de bacteriemia en pacientes post-trasplantados tras la endoscopia. Un estudio realizado por Kaw y colaboradores, no recogió episodios de bacteriemia después de 53 endoscopias. Sin embargo, Bianco y colaboradores, constataron que 9 de 47 pacientes (19%) desarrollaron bacteriemia en las 24 horas posteriores a la realización de la endoscopia, presentando hipotensión, fiebre  $> 38,5^\circ\text{C}$  y hemocultivo positivo. Ocho de los 9 pacientes recibían prednisona ( $p < 0,01$ ) (77). No obstante, la EICH no parece ser un factor de riesgo para desarrollar bacteriemia en sí misma (78).

### **1.4.3 OTRAS PRUEBAS DE IMAGEN**

Las imágenes de tomografía computarizada (TC) que se obtienen cuando la EICH aguda se está estableciendo revelan engrosamiento intestinal, especialmente en el intestino delgado, aunque este hallazgo no es específico. El número de segmentos engrosados se correlaciona con la gravedad de la EICH (79). Sin embargo en la práctica diaria no se ha probado que la TC sea una prueba específica (80). Un estudio realizado por un grupo alemán utilizó la ultrasonografía doppler de alta resolución en 12 pacientes con EICH gastrointestinal. Todos los pacientes presentaban engrosamiento de la pared intestinal a

nivel ileocecal. También presentaban engrosadas otras áreas intestinales, pero ninguna de manera tan evidente. El doppler mostraba un flujo sanguíneo normal o aumentado a nivel de la arteria mesentérica superior y en el área ileocecal en 8 pacientes, y disminuido en 4. Los pacientes con flujo disminuido presentaban cambios isquémicos en la colonoscopia y EICH refractaria grave. Los autores sugieren que la demostración de la disminución o la ausencia de flujo arterial intestinal es un signo de mal pronóstico y el engrosamiento intestinal puede sugerir la presencia de EICH antes de que se presenten los síntomas (81). Estos estudios se han realizado con un tamaño muestral pequeño y sin un grupo control adecuado por lo que sus resultados pueden considerarse preliminares.

## **1.5 EICH E INFECCIONES GASTROINTESTINALES**

Las enfermedades infecciosas en general pueden contribuir con una elevación de citocinas inflamatorias tras un TACH (82) y de este modo inducir una respuesta inmune que precipitaría una EICH (83) (Figura 12). Se han realizado varios estudios que relacionan el ambiente bacteriológico con el riesgo de desarrollar EICH (84), principalmente con las bacterias intestinales. Beelen y cols, investigó la influencia de la descontaminación de la flora intestinal en el desarrollo de la EICH aguda con afectación moderada-grave. Realizó un estudio retrospectivo con 194 pacientes y posteriormente uno prospectivo con 134 pacientes sometidos a TACH. La descontaminación intestinal con ciprofloxacino y metronidazol prevenía del desarrollo de EICH (85; 86). La utilización de metronidazol podría reducir la incidencia de infección por *Clostridium difficile*, patógeno asociado con el inicio de una EICH (87; 88). Sin embargo, se ha establecido recientemente que la microbiota juega un papel importante en la orquestación de la respuesta inmune que culmina en la EICH tanto en modelos humanos como murinos. Jenq R y cols relacionan la abundancia de la bacteria del género *Blautia*

(comensal común en la flora intestinal de humanos) con un efecto protector frente al desarrollo de la EICH (89). Otras bacterias estudiadas son las bacterias del género *Lactobacillales*, que en modelos murinos, mejoran el pronóstico de los pacientes sometidos a TACH (90). Recientemente Taur y colaboradores han reportado que los pacientes con una menor diversidad de microorganismos en la flora intestinal en el momento del trasplante presentaban una mayor mortalidad (no relacionada con la reaparición de la enfermedad), especialmente relacionada con el desarrollo de EICH (91). Teniendo en cuenta los diferentes regímenes de acondicionamiento utilizados o los tratamientos profilácticos frente a la EICH, cabría esperar que la manipulación de la flora intestinal fuera mayor en regímenes mieloablativos (en comparación con los acondicionamientos de intestinidad reducida) y en pacientes que reciben tratamientos cortos con metotrexato en comparación con el micofenolato de mofetilo ya que en estas circunstancias se ha observado una mayor incidencia de EICH (92). En la figura 11 se muestran los mecanismos de influencia de las infecciones en el desarrollo de la EICH.

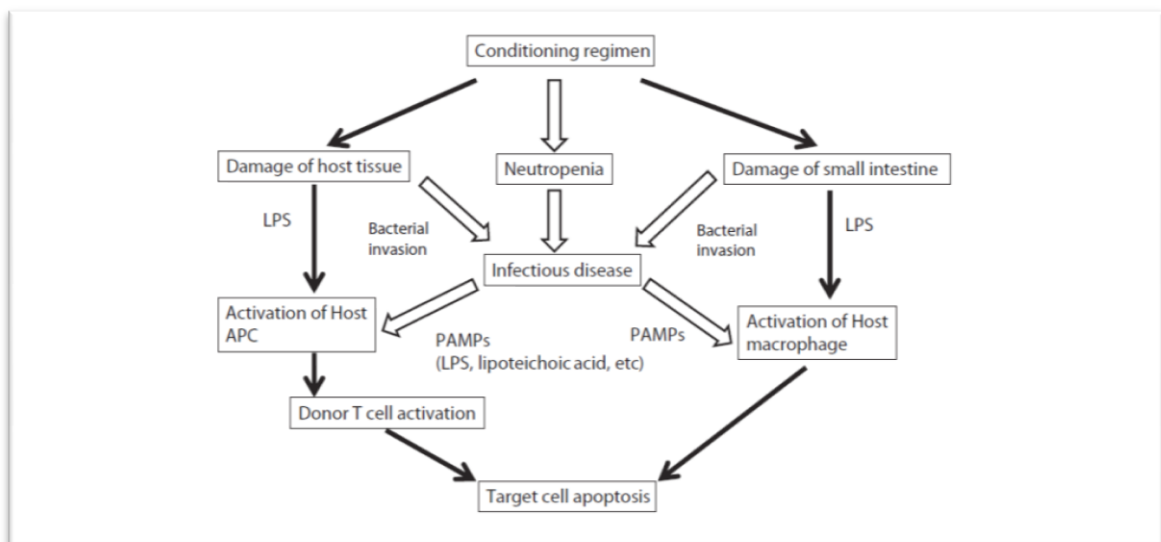


Figura 11: Posible implicación de la infección bacteriana en la patogénesis de la EICH.

### 1.5.1 EICH Y HELICOBACTER PYLORI

El *Helicobacter pylori* (HP) es un bacilo gran negativo que se ha relacionado con múltiples enfermedades digestivas, incluido el cáncer gástrico y el linfoma (93). La infección por HP coexiste con la raza humana desde hace más de 50.000 años (94; 95). Consiste en una infección que se adquiere en la infancia y que si no es tratada, está presente en el ser humano a lo largo de su vida, produciendo sintomatología solamente en algunos infectados (96; 97). La infección crónica por HP puede provocar hallazgos endoscópicos similares a los que provoca la afectación por EICH en los grados I y II y en la histología pueden observarse cuerpos apoptóticos (98; 99). El método de elección para detectar la presencia de HP en aquellos pacientes a los que se va a realizar una endoscopia es la biopsia y el examen histológico de la muestra con sensibilidad, especificidad, VPP y VPN del 100%, 66%, 84% y 100% respectivamente (100) y para aquellos que no tienen indicación clínica de gastroscopia el test de aliento con C-13 es la mejor opción (101).

La colonización por HP no es exclusiva de la mucosa gástrica. Se ha detectado HP mediante cultivo, PCR e histología en múltiples localizaciones: Intestino delgado, colon, mucosa nasal, oído medio, arterias coronarias, etc (93) (Figura 12). Además, numerosos estudios ha relacionado la presencia de HP en estas localizaciones con el desarrollo de ciertas enfermedades, en ocasiones como factor causal (como la enfermedad coronaria aguda (102), el cáncer de laringe (103), el glaucoma (104) o los pólipos nasales (105)) y en otras como factor protector (como la enfermedad inflamatoria intestinal (106), el esófago de Barrett y el adenocarcinoma esofágico (107; 108)). Además de en estas localizaciones, la infección por HP se ha relacionado con otras enfermedades sin un claro efecto local por la presencia de la bacteria como enfermedades autoinmunes (109), enfermedades neurológicas (esclerosis múltiple (110), enfermedad de Parkinson (111), enfermedad de Alzheimer (112)...) (110), enfermedad de Parkinson (111), enfermedad de Alzheimer (112)...) (110), enfermedad de Parkinson (111), enfermedad de Alzheimer (112)...

enfermedades hematológicas (anemia por déficit de hierro (113; 114), púrpura trombocitopénica idiopática (115)...) o enfermedades alérgicas (alergia a alimentos (116), asma (117; 118) o rinitis alérgica (119)) (tabla 3).

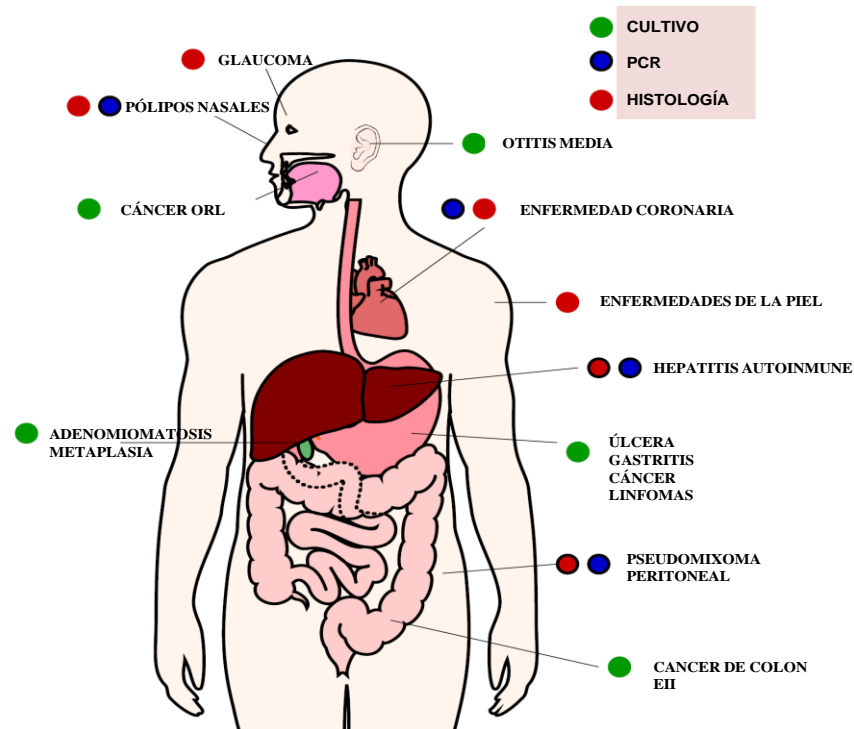


Figura 12: Localizaciones donde se ha detectado mediante diversas técnicas endoscópicas la presencia de *Helicobacter pylori* y su asociación con ciertas enfermedades según la localización. De Testerman TL et al (93).

Dentro de las patologías autoinmunes asociadas a un efecto protector de HP cabe destacar la relación encontrada mediante varios meta-análisis con el asma (117; 118) y la atopia (120). Con respecto al asma, ambos meta-análisis coinciden en que el HP presenta un efecto protector contra el desarrollo de asma tanto en niños como en adultos. Con respecto a la atopia, un meta-análisis de 16 estudios con 21348 pacientes obtiene una reducción significativa del diagnóstico de atopia en los pacientes portadores de infección por HP (OR=0.82; 95% intervalo de confianza (IC) 0.73–0.91;  $p < 0.01$ ). Además se ha reportado en varios estudios la asociación negativa entre la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y la infección por HP. Así en un reciente meta-análisis de

23 estudios con un total de 5903 pacientes (121), se evaluó la relación entre la infección por HP y la EII. Trece de los 23 estudios obtuvieron un riesgo relativo (RR) significativo menor de 1 y ninguno de ellos mayor de 1. El 27,1% de los pacientes con EII eran portadores de infección por HP en comparación con el 40,9% de los pacientes con infección en el grupo control. El RR estimado fue del 0,64 (IC 95%: 0,54-0,75). Los estudios incluidos eran heterogéneos de manera significativa (I<sup>2</sup> =75.8%) y estas diferencias no se explicaban por el método utilizado en el diagnóstico de EII o de infección por HP, la procedencia geográfica del estudio o la edad. Los autores concluyen que a pesar de la heterogeneidad de los estudios los resultados sugerían que la infección por HP podría tener un efecto beneficioso en el desarrollo de la EII aunque son necesarios nuevos estudios bien diseñados y con modelos animales para confirmar este efecto. Posterior a la publicación de este meta-análisis, el mismo grupo publicó un interesante estudio en el que evaluó la acción del HP sobre la producción de citocinas inmuno-reguladoras o inmuno-estimuladoras en un modelo murino al que se le había inducido una colitis con sulfato sódico de dextrano (DSS) (122). Los autores demuestran que el genoma del HP posee una capacidad inmuno-reguladora que provoca una disminución de la respuesta inflamatoria mediante la interacción con células dendríticas de la mucosa intestinal tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. En concreto disminuye la producción de IL-12 y de interferón tipo I, dos citocinas pro-inflamatorias. En cuanto a la relación entre EICH y HP se han publicado, previos a la realización de este trabajo, dos estudios con resultados contradictorios (123; 124).



Tabla 3: Relación entre la infección por *Helicobacter pylori* y múltiples enfermedades idiopáticas.

GRUPO/ENFERMEDAD	META-ANÁLISIS	ASOCIACIÓN
<b>Enfermedades autoinmunes*</b>		
Síndrome de Sjögren	NO	NO
Artritis Reumatoide	NO	NO
Lupus Eritematoso Sistémico (125)	NO	Protector
Urticaria Crónica (126)	NO	NO
Enfermedad de Graves (127)	NO	Causal
<b>Enfermedades neurológicas</b>		
Esclerosis Múltiple (110)	NO	Protector
Síndrome de Guillain Barré (128)	NO	Causal
Enfermedad de Parkinson (111)	NO	Causal
Enfermedad de Alzheimer (112)	NO	Causal
<b>Enfermedades hematológicas</b>		
Anemia por Déficit de Fe (114)	SI	Causal
Púrpura Trombocitopénica Idiopática (115)	NO	Causal
<b>Enfermedades alérgicas</b>		
Asma (118)	SI	Protector
Atopia (120)	SI	Protector
Rinitis Alérgica (119)	NO	Protector
Alergia a alimentos (116)	NO	Protector

\*Existen más de 90 enfermedades autoinmunes sobre las que el efecto de HP ha sido estudiado (109). Las que muestra esta tabla son solo algunos ejemplos.



*HIPÓTESIS DE  
TRABAJO Y  
OBJETIVOS*





## 2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

La enfermedad de injerto contra huésped cuando afecta al tracto gastrointestinal plantea un reto diagnóstico tanto para el hematólogo como para el gastroenterólogo, ya que los hallazgos endoscópicos e histológicos no son específicos. En muchas ocasiones la presencia de infección por *Helicobacter pylori* favorece la confusión generada por los hallazgos endoscópicos e histológicos y su correlación con la clínica, de manera que no existe una recomendación universalmente aceptada ante el hallazgo de infección por HP en estos pacientes. Nuestras hipótesis de trabajo consisten en:

- Es posible mejorar el rendimiento de los estudios endoscópicos en la enfermedad de injerto contra huésped gastrointestinal a partir de los últimos avances técnicos en endoscopia digestiva (ultrasonografía endoscópica e imagen de banda estrecha).
- El *Helicobacter pylori* ejerce un papel protector en el desarrollo de la enfermedad de injerto contra huésped gastrointestinal.

Nuestros objetivos son:

- Análisis retrospectivo del procedimiento endoscópico utilizado habitualmente y de su rentabilidad en el diagnóstico de la EICH.
- Analizar la correlación entre los hallazgos endoscópicos macroscópicos y el resultado histológico según las clasificaciones correspondientes en el diagnóstico de la EICH.
- Análisis de la utilidad de la ultrasonografía endoscópica y del NBI en el diagnóstico de EICH en comparación con la técnica habitual.

- Análisis de la incidencia de infección pre-trasplante por *Helicobacter pylori* en los pacientes con trasplante alogénico de células hematopoyéticas y su influencia en el desarrollo posterior de EICH.

**MATERIAL Y  
MÉTODOS**







### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio en dos fases:

- Retrospectiva, con el análisis de los trasplantes alogénicos de células hematopoyéticas realizados en el Hospital Universitario de Salamanca desde 1998 a 2009.
- Prospectiva, con inicio en 2012 y con un periodo de inclusión de pacientes de mínimo 2 años ESTUDIO PEEICH: NUEVAS TÉCNICAS ENDOSCÓPICAS EN LA ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUESPED Y SU ASOCIACIÓN CON LA INFECCIÓN POR HELICOBACTER PYLORI..

#### **DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO**

##### ***ESTUDIO RETROSPECTIVO***

Estudio retrospectivo mediante la recopilación de datos clínicos, histológicos y endoscópicos a partir de las bases de datos del Servicio de Hematología, la base de datos de la Unidad de Endoscopias del Servicio de Aparato Digestivo, la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica y los datos recopilados en la historia clínica de cada paciente del Hospital Universitario de Salamanca desde 1998 a 2009.

##### ***ESTUDIO PROSPECTIVO***

Esta fase del estudio ha sido aprobada por el comité ético del Hospital Universitario de Salamanca (anexo 1).

Estudio prospectivo de pacientes con los siguientes criterios:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Pacientes mayores de 18 años candidatos a recibir un trasplante alogénico de células hematopoyéticas independientemente de la indicación del mismo.

#### CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

Pacientes menores de 18 años. Pacientes que expresen voluntariamente el deseo de no participar en el estudio.

#### FASE 1: SELECCIÓN DE CANDIDATOS.

##### LUGAR: CONSULTA EXTERNA

DESCRIPCIÓN: A los pacientes que cumplan los criterios de inclusión se les ofrecerá la posibilidad de participar en el estudio y aquellos que acepten se les entregarán el consentimiento informado (anexo 2). Una vez leído y firmado dicho consentimiento se le realiza una encuesta sobre historia previa de úlcera péptica o posibles tratamientos erradicadores de HP (anexo 3) junto con el kit para la realización del test de aliento de *Helicobacter pylori* con C13. Una vez realizado el test en su domicilio, el paciente lo entregará en su centro de salud correspondiente. En caso de estar tomando un inhibidor de la bomba de protones deberá realizarse el test de aliento tras 15 días de la suspensión del mismo pudiendo sustituir el tratamiento antiácido por almagato (ALMAX<sup>®</sup>) y reintroducir el tratamiento con IBP tras la realización del test si fuera necesario.

#### FASE 2: TRASPLANTE ALÓGENICO.

##### LUGAR: HOSPITALIZACIÓN DE HEMATOLOGÍA.

DESCRIPCIÓN: El trasplante así como el seguimiento post-trasplante se llevara a cabo de acuerdo con el Manual de Procedimientos de la Unidad de Trasplante. Los datos correspondientes a cada paciente se introducen en una base de datos y se envían al registro europeo de trasplante.

#### FASE 3:

- PACIENTE CON SÍNTOMAS COMPATIBLES CON EICH DIGESTIVO

##### LUGAR: UNIDAD DE ENDOSCOPIAS

DESCRIPCIÓN: Si el paciente comenzase con síntomas digestivos compatibles con EICH gastrointestinal alta o baja se contactará con el servicio de Aparato Digestivo para la realización precoz (24-48 horas) de un estudio endoscópico que constará de los siguientes procedimientos:

- SEDACIÓN
- ECOENDOSCOPIA CON MEDICIÓN DE LAS CAPAS DE LA PARED GÁSTRICA (cuerpo y antro) Y DUODENAL
- GASTROSCOPIA CONVENCIONAL CON TOMA DE BIOPSIAS ANTRALES DE CUERPO GÁSTRICO Y DE DUODENO EN NÚMERO DE 3 EN CADA LOCALIZACIÓN.

Se podrán realizar posteriormente los estudios endoscópicos necesarios en los casos en los que los hallazgos endoscópicos e histológicos no sean diagnósticos. En las biopsias se estudiará la presencia de HP. No se erradicará HP salvo que esté indicado según la II conferencia española de consenso sobre infección por HP (129) y bajo la supervisión de un gastroenterólogo. En resumen se erradicará si:

- ÚLCERA GÁSTRICA O DUDENAL.
- DUDENITIS EROSIVA.
- PACIENTE INTERVENIDO DE CÁNCER GÁSTRICO O ANTECEDENTES FAMILIARES DE PRIMER GRADO DE CANCER GÁSTRICO.
- LINFOMA MALT DE BAJO GRADO.
- GASTRITIS LINFOCÍTICA O ENFERMEDAD DE MÉNÉTRIER.

- PACIENTE SIN SÍNTOMAS COMPATIBLES CON EICH DIGESTIVO

LUGAR: CONSULTAS DE HEMATOLOGÍA

Si el paciente no desarrollase síntomas compatibles con EICH gastrointestinal durante la evolución se realizará test de aliento a partir de los 100 días post-trasplante.

FASE 4: RECOGIDA DE DATOS Y ANÁLISIS.

DESCRIPCIÓN: Se recopilarán los datos obtenidos y se procederá al análisis de los mismos.



**RESULTADOS**





## 4. RESULTADOS

### 4.1 RELACIÓN DE ARTÍCULOS PUBLICADOS O EN FASE DE REVISIÓN

#### 4.1.1 *Helicobacter pylori* Infection and Graft-versus-Host Disease

*Velasco Guardado A<sup>1</sup>, López-Corral L<sup>2</sup>, Pérez-Simón J.A<sup>2</sup>, Caballero-Velázquez T<sup>2</sup>,  
Flores Corral T<sup>3</sup>, Caballero Barrigón D<sup>2</sup>, Rodríguez Pérez A<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup>Department of Gastroenterology, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain.

<sup>2</sup>Department of Hematology, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain.

<sup>3</sup>Department of Pathology, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain.

**Biol Blood Marrow Transplant. 2011 May;17(5):765-9.**





## RESUMEN

El tracto gastrointestinal es la principal diana de la Enfermedad de Injerto contra Huésped. Su Diagnóstico se base en los hallazgos endoscópicos e histológicos. El HP es una bacteria espiral gran negativa que se ha relacionado con el desarrollo de gastritis, enfermedad péptica ulcerosa, linfoma asociado a la mucosa gástrica y el adenocarcinoma y su presencia se observa con frecuencia en el estudio histológico de la mucosa gástrica de pacientes sometidos a trasplante alogénico. Se desconoce el papel que juega el HP en el desarrollo de la EICH. Realizamos un estudio retrospectivo entre el 1 de enero de 1990 y el 31 de diciembre de 2008 en el que se recogieron un total de 338 endoscopias digestivas altas (gastroscopias) realizadas a pacientes que habían recibido un trasplante alogénico de células hematopoyéticas y que desarrollaron síntomas clínicos sospechosos de EICH (198 pacientes). Se confirmó mediante hallazgos histológicos EICH aguda en 97 pacientes (51,3%) y EICH crónica en 68 pacientes (36%). Se detectó infección por HP en 69 pacientes (35%). Se observó un efecto modulador negativo en los pacientes con infección por HP para el desarrollo de EICH aguda (RR, 0.60; intervalo de confianza al 95%: 0,46-0,79;  $p < 0,001$ ) y EICH crónica (RR: 0,75; intervalo de confianza al 95%: 0,61-0,92;  $p < 0,016$ ). Además, la presencia de HP se correlacionó inversamente con la gravedad histológica de la EICH ( $p < 0,003$ ). Nuestros hallazgos sugieren que la infección por HP posee un efecto modulador negativo sobre el desarrollo de la EICH.

## **ABSTRACT**

Introduction: The gastrointestinal (GI) tract is the main target site of Graft-Versus-Host Disease (GVHD); diagnosis is based on endoscopic and histological findings. *Helicobacter pylori* (HP) is a gram-negative spiral bacterium linked to gastritis, peptic ulcer disease, gastric MALT lymphoma and adenocarcinoma, and is frequently observed in endoscopies of transplant patients. The role, if any, played by HP infection in the development of acute GVHD is unknown. We performed a retrospective study from 1<sup>st</sup> January 1990 to 31<sup>st</sup> December 2008 on 338 upper gastrointestinal endoscopies (gastrosopies) performed on patients who underwent an allogeneic transplant with clinical suspicion of GVHD (198 patients). Results: Acute and chronic GVHD was confirmed from histological features in 97 (51.3%) and 68 (36%) patients, respectively. HP infection was observed in 69 (35%) patients and had a negative modulating effect on the development of acute GVHD (RR=0.60; 95% CI: 0.46-0.79; p=0.001) and chronic GVHD (Relative Risk=0.75; 95% CI: 0.61-0.92; p=0.016). Furthermore, the presence of HP was inversely correlated with the histological severity of GVHD (p=0.003). Conclusions: Infection with HP may have a negative modulating effect on GVHD.

**KEY WORDS:** Transplantation; endoscopy; Bacterial colonization.

## INTRODUCTION

Allogeneic stem cell transplant is the best therapeutic option for many patients with haematological malignancy diseases, although it is associated with significant morbidity and mortality, mostly due to graft-versus-host disease (GVHD) (1). Acute gastrointestinal GVHD presents as nausea, anorexia, vomiting, diarrhoea, abdominal pain, haemorrhage and ileus with a >80% risk of mortality in severe forms (2). The gastrointestinal tract is also a target organ for chronic GVHD. Clinical manifestations include anorexia, nausea, vomiting, diarrhoea, weight loss, oesophageal stricture, or concentric rings and pancreatic exocrine insufficiency (3).

Due to the frequency of gastrointestinal symptoms during the first 100 days after haematopoietic stem cell transplant (HSCT) more than 50% of the patients will be referred for an endoscopic evaluation of the enteric tract; differential diagnosis of GVHD and other conditions such as toxicity from chemotherapy or radiotherapy, drug-related side-effects, bacterial, viral, parasitic or fungal infections should be performed (4; 5). Endoscopic evidence of GVHD in stomach and duodenum may vary from normal mucosa to unspecific signs such as oedema, erythema, frank ulcers and erosion of the mucosa (6).

*Helicobacter pylori* (HP) is a gram-negative bacillus that has been linked to several digestive disorders, including gastric cancer and MALT lymphoma. HP infection has coexisted with the human species for more than 50,000 years (7; 8). It consists of an infection that is acquired during childhood and, if untreated, remains present in body throughout an individual's entire life, although inducing symptoms only in a subset of patients (9; 10). Prevalence of HP infection is related to age, socioeconomic class and country of origin, varying between 20-30% in developed countries and 60-80% in some

ethnic groups and developing countries (11). Humans are the primary reservoir and several transmission methods are proposed (oral-oral, waterborne transmission, faecal-oral, gastro-oral) (12). Chronic HP infection can produce endoscopic findings similar to those caused by stage I and stage II GVHD, and histological analysis may reveal apoptotic bodies (13; 14). Mucosal biopsy and histological examination of the specimen for the presence of HP is the method of choice for patients in whom an endoscopy is clinically indicated, and has a sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of 100%, 66%, 84% and 100%, respectively (15).

We have performed a retrospective study in patients with gastrointestinal symptoms after allogeneic stem cell transplant referred for an endoscopy to the Gastroenterology Department in order to establish the diagnosis of GVHD and assess the presence of HP infection as well as any association of this infection with the development and severity of GVHD.

## **MATERIALS AND METHODS**

We performed a retrospective study in all the patients who received an allogeneic HSCT in the University Hospital of Salamanca between 1<sup>st</sup> January 1990 and 31<sup>st</sup> December 2008, and who were referred to our Department for an upper gastrointestinal endoscopy due to suspicion of GVHD. Patient and donor characteristics are summarized in table 1. The graft sources were not manipulated and there were no mismatched donors. All patients received bacterial prophylaxis with meropenem during the period of neutropenia, and omeprazol was administered until engraftment and achieve adequate oral intake. The endoscopic findings of these explorations, the histological findings of the biopsies (three biopsies at least) performed during the procedure, and the presence of HP were retrospectively compiled. One pathologist involved in allogeneic transplant

for 15 years reviewed all the samples. The stain used was standard haematoxylin and eosin (H&E). The presence of apoptotic bodies in the biopsy (minimum criterion), crypt abscesses and/or destruction of glands were considered criteria for a diagnosis of acute or chronic GVHD, after ruling out other causes that may also induce these findings, such as drug-related toxicity or infections, with blood and/or stool cultures, CMV infection by antigenaemia assay, or reducing the dose of suspected drug.

Twenty-six patients needed two endoscopies to confirm or rule out acute GVHD in the first 100 days. We have included the endoscopy in which the endoscopic and histological features were of a higher grade. Endoscopic findings have been gradually staged according to the classification proposed by Cruz-Correa (16): Stage 0: Normal; Stage I: loss of vascular pattern and/or focal moderate erythema; Stage II: oedema and/or diffuse moderate erythema; Stage III: oedema, erythema, erosions and/or bleeding; Stage IV: Ulceration, exudates and/or bleeding.

In the histological analysis, the presence of apoptotic bodies was considered to be “compatible with GVHD”. The histological findings have been gradually staged according to the classification proposed by McDonald and Sales (17) in 1984: Grade 0: normal; Grade I: single cell necrosis (apoptosis) noted under medium power; Grade II: evidence of epithelial damage by crypt/gland abscesses, epithelial flattening or crypt/gland dilations; Grade III: dropout of one or more crypt/gland; Grade IV: total epithelial denudation.

Diagnosis of HP infection was concluded if the bacterium was present in the biopsy of the gastric antrum.

In the statistical analyses, carried out with SPSS v. 15.0 (Chicago, Illinois, USA), percentages were used for categorical variables, while measures of central tendency (mean and/or median) and dispersion (standard deviation) were used for continuous

variables. All dichotomous variables were analyzed with  $\chi^2$  contingency tests in order to compare the frequencies of of categorical variables, or, where appropriate, Fisher's exact test and Monte Carlo simulations. A 95% confidence intervals for odds ratio were derived. Continuous and categorical variables were analyzed with ANOVA. Multivariate logistic regression was used to analyse confounding factors. Statistical significance was concluded for values of  $p < 0.05$ .

## RESULTS

Baseline characteristics of the study group are summarized in table 1 and table 2.

Table 1: Baseline characteristics of the study group.

	n (Valid percentage)
<i>Patients</i>	197
<i>Sex</i>	
Men	114 (57.9)
Women	83 (42.1)
<i>Mean age, years (standard deviation)</i>	45.3 (14.0)
<i>Type of donor</i>	
Related	130 (69.5)
Unrelated	51 (27.3)
Others	6 (3.2)
<i>Source of progenitor cells</i>	
Peripheral blood	155 (83.3)
Bone marrow	31 (16.7)
<i>Type of conditioning<sup>†</sup></i>	
Reduce intensity	118 (61.5)
Myeloablative	74 (38.5)
ATG	5 (2.5)
Campath	2 (1)
TBI (myeloablative)	17(23)
<i>Donor recipient gender mismatch</i>	72 (42.4)
<i>GVHD prophylaxis*</i>	
CSA / tacrolimus + MTX	142 (80.2)
CSA / tacrolimus + MMF	22 (12.4)
Others	13 (7.4)

<i>Endoscopic studies</i>	379
Gastrosopies	338 (89.2)
First 100 days	223 (66.0)
Days after transplant / <i>mean (standard deviation)</i>	41 (24.0)
After 100 days	115 (34.0)
Days after transplant / <i>mean (standard deviation)</i>	269 (210.0)

<sup>†</sup>ATG = antithymocyte globulins, TBI = total body irradiation.

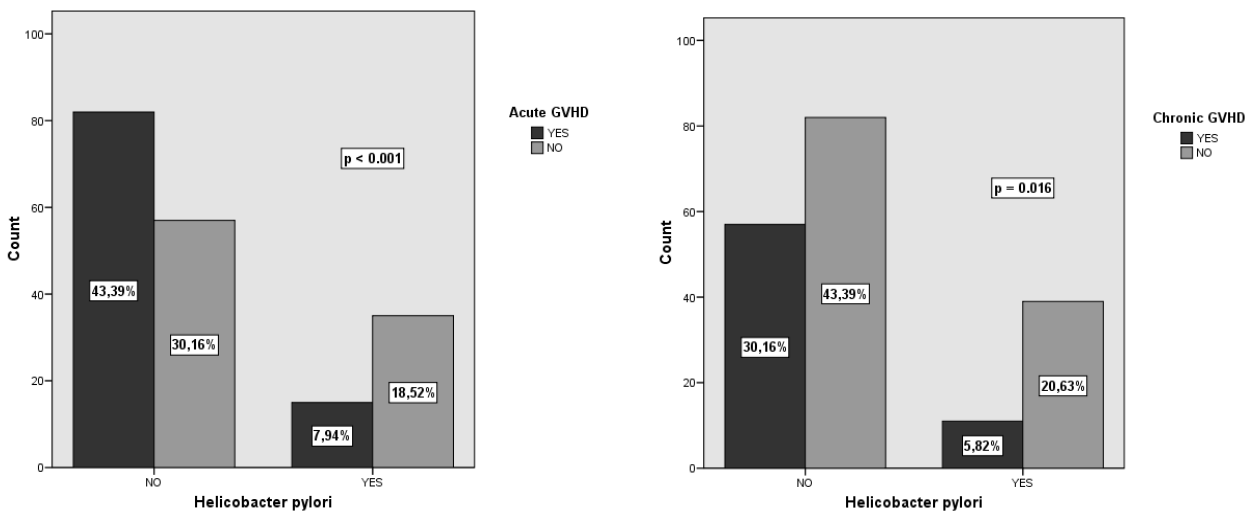
\* CSA = cyclosporine, MTX = methotrexate, MMF = mycophenolate mofetil.

HP infection was observed in 69 patients (35%). The incidence of HP was significantly lower in patients with acute GVHD (15.5%) than in those without it (38%) (RR=0.58; 95% CI: 0.44-0.76; p<0.001) (Figure 1). The association was confirmed by logistic regression adjusted for sex, age, donor type, source of progenitor cells, gender mismatch and type of conditioning regimen (OR=2.87; 95% CI: 1.33-6.16; p=0.007) and for GVHD prophylaxis (OR=2.64; 95% CI: 1.25-5.55; p=0.010).

Table 2: Frequency and severity of Graft-Versus-Host Disease (GVHD).

	n (Valid percentage)
<i>Overall GVHD</i>	182 (92.4)
<i>Acute GVHD</i>	137 (75.2)
<i>GI GVHD</i>	97 (70.8)
Grade I	23 (23.7)
Grade II	56 (57.7)
Grade III	15 (15.4)
Grade IV	3 (3.1)
<i>Cutaneous GVHD</i>	52 (38)
<i>Liver GVHD</i>	30 (21.9)
<i>Chronic GVHD</i>	120 (65.9)
<i>Gastrointestinal GVHD</i>	68 (56.6)
Mild	20 (29.4)
Moderate	36 (53)
Severe	12 (17.6)
<i>Cutaneous GVHD</i>	60 (50.0)
<i>Hepatic GVHD</i>	37 (30.8)

Similarly, the incidence of HP in patients with histological chronic GVHD was also lower than in those without it (16.2% vs. 32.2%, respectively; RR=0.75; 95% CI: 0.61-0.92; p=0.016) (figure 2). These results were confirmed using logistic regression adjusted by sex, age, donor type, source of progenitor cells, gender mismatch and type of conditioning regimen (OR=2.59; 95% CI: 1.12-5.96; p=0.025) but not when adjusted by GVHD prophylaxis.



Figures 1 and 2: Bar chart showing incidence of HP infection among patients with or without acute and chronic GVHD.

Interestingly, upon selecting patients without acute GVHD, the presence of HP in the biopsies performed the first 100 days after transplant was related to a significantly lower risk for the subsequent development of chronic GVHD. In this regard, we observed that 21.7% of the patients with HP infection developed chronic GVHD compared with 52.2% of HP-negative patients (RR=0.73; 95% CI: 0.58-0.93; p=0.011). Multivariate logistic regression confirmed this association when adjusted by sex, age, donor type, source of progenitor cells and type of conditioning regimen (OR=3.87; 95% CI: 1.25-11.94; p=0.018) and by GVHD prophylaxis (OR=3.45; 95% CI: 1.10-10.83; p=0.034).



Furthermore, HP infection was associated with significantly lower histological severity (11.1% severe forms in HP-positive cases vs. 88.9% severe forms in HP-negative cases;  $p=0.003$ ), as indicated by the negative Pearson's correlation coefficient ( $r = -0.26$ ;  $p<0.001$ ) (table 3) while, by contrast, we did not identify any significant correlation with endoscopic severity according to the Cruz-Correa classification.

Table 3: Relationship between histological grade of gut GVHD according to McDonald and Sales classification and *Helicobacter pylori* (HP) infection.

	Not compatible	Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
HP-positive n (% of histological grade)	16 (41.0)	26 (31.0)	4 (9.1)	2 (11.1)	0
HP-negative n (% of histological grade)	23 (59.0)	58 (69.0)	40 (90.9)	16 (88.9)	0

The overall GVHD rate was 92.4% ( $n=182$ ) and HP infection did not impact overall GVHD incidence ( $p=0.14$ ). The median follow-up was 64.5 months (31.2-108.7) and 47 patients (23.8%) have died due to non-relapse mortality with a rate of GVHD-related mortality of 40.4% ( $n=19$ ). The response rate to immunosuppressive therapy was 77.7% ( $n=153$ ).

## DISCUSSION

HP stimulates the release of a variety of inflammatory mediators, both directly by bacterial products and indirectly as a result of interaction with gastric epithelial cells. These factors allow HP to thrive in a niche that is inhospitable to almost every other enteric organism (18).

Recent epidemiological studies suggest that colonization with HP might protect against the development of certain autoimmune disorders, such as asthma (19; 20). We should

emphasize the negative association that has been established in several studies between inflammatory bowel disease (IBD) and HP infection. A recent meta-analysis of 23 studies with a total of 5,903 patients assessed the relation between HP infection and IBD (21). Thirteen of the studies noted a significant relative risk lower than 1, and in none of them was it higher than 1. Twenty-seven per cent of the patients with IBD carried an HP infection, compared with 40.9% infected patients in the control group. The authors concluded that these results suggest that HP infection might have a beneficial effect in the development of IBD. Further studies are necessary to confirm this meta-analysis.

On the other hand, recent laboratory tests ascribe a certain modulating capacity of the immune response to HP, with an increase in the regulatory T cells of the gastric mucosa that might modify the immune response and prevent a Th1/Th17 response (13; 14). Chen and Blaser suggest that the intensity of the response of the host against especially aggressive HP strands (with the *cagA* gene) might alter the pattern of the Th1/Th2 immune response with the subsequent induction of immunoregulating lymphocytes that may prevent immune hyper-reactivity responses, such as asthma or allergy in cases where the Th2 pattern is predominant (22).

Two prospective studies of the relationship between GVHD and HP have been published to date. The first, by Correia-Silva et al., found no relationship between HP infection (established on the basis of PCR in saliva) and the development of GVHD in 46 patients who received an allogeneic transplant (23). The second, by Au et al. (24), studied the association between HP infection prior to transplant and the subsequent development of mucositis (drug-related toxicity) and acute GVHD in 128 patients. No increase in the risk of mucositis was found in patients with HP colonization, but these patients showed a significant reduction in the risk of developing acute gastrointestinal

GVHD (RR=0.36; 95% CI: 0.13-0.98; p=0.04). In the multivariate analysis, the absence of HP infection and the presence of mucositis remained as independent predictive factors of the development of gastrointestinal GVHD.

In our study, we observed that HP may protect against the development of GVHD, and this effect remains if we consider patients who have not suffered acute GVHD. Accordingly, HP-positive patients had a lower risk of acute and chronic GVHD. It could be argued that gastroscopy was only performed among patients with gastrointestinal symptoms, so that in the absence of acute GVHD, we might have selected patients with other concomitant comorbidities, such as HP infection, which could account for these symptoms. Nevertheless, when we specifically analyzed patients without acute GVHD, the presence of HP in the endoscopy made during the first 100 days post-transplant significantly decreased the risk of subsequent chronic GVHD. These results are consistent with the negative correlation observed between HP infection and histological severity. Type of conditioning and donor, source of progenitor cells and type of GVHD prophylaxis were not confounding variables in the association between GVHD and HP.

This study has limitations, such as its retrospective nature and the fact that the diagnosis of HP infection was made after the onset of symptoms. The standard H&E stain is excellent for determining histologically chronic or chronic active inflammation and demonstrates HP if large numbers of bacteria are present. Silver staining is better at detecting the organism when few bacteria are present, but does not show tissue histology optimally. The best alternative is the use of a combination of an H&E and a Diff-Quick stain, so we have probably underestimated the incidence of HP (25).

As far as we know, this is the first study to suggest that HP infection could have a protective effect in developing acute and chronic GVHD.

The current study favours future prospective studies, evaluating the presence of HP before the transplant (urea breath test) and the relationship between CagA strands with the subsequent development of GVHD.

## REFERENCES

1. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol* 2007;25:139-170.
2. Leisenring WM, Martin PJ, Petersdorf EW, Regan AE, Aboulhosn N, Stern JM, Aker SN, Salazar RC, McDonald GB. An acute graft-versus-host disease activity index to predict survival after hematopoietic cell transplantation with myeloablative conditioning regimens. *Blood* 2006;108:749-755.
3. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, Martin P, Chien J, Przepiorka D, Couriel D, Cowen EW, Dinndorf P, Farrell A, Hartzman R, Henslee-Downey J, Jacobsohn D, McDonald G, Mittelman B, Rizzo JD, Robinson M, Schubert M, Schultz K, Shulman H, Turner M, Vogelsang G, Flowers ME. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:945-956.
4. Cox GJ, Matsui SM, Lo RS, Hinds M, Bowden RA, Hackman RC, Meyer WG, Mori M, Tarr PI, Oshiro LS, . Etiology and outcome of diarrhea after marrow transplantation: a prospective study. *Gastroenterology* 1994;107:1398-1407.
5. Ross WA, Ghosh S, Dekovich AA, Liu S, Ayers GD, Cleary KR, Lee JH, Couriel D. Endoscopic biopsy diagnosis of acute gastrointestinal graft-versus-host disease: rectosigmoid biopsies are more sensitive than upper gastrointestinal biopsies. *Am J Gastroenterol* 2008;103:982-989.
6. Fallows G, Rubinger M, Bernstein CN. Does gastroenterology consultation change management of patients receiving hematopoietic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant* 2001;28:289-294.
7. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, Blaser MJ, Graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, Yamaoka Y, Megraud F, Otto K, Reichard U, Katzowitzsch E, Wang X, Achtman M, Suerbaum S. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 2003;299:1582-1585.
8. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, van der Merwe SW, Yamaoka Y, Graham DY, Perez-Trallero E, Wadstrom T, Suerbaum S, Achtman M. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 2007;445:915-918.
9. Kuipers EJ, Pena AS, van Kamp G, Uytterlinde AM, Pals G, Pels NF, Kurz-Pohlmann E, Meuwissen SG. Seroconversion for *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1993;342:328-331.
10. Malaty HM, El Kasabany A, Graham DY, Miller CC, Reddy SG, Srinivasan SR, Yamaoka Y, Berenson GS. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *Lancet* 2002;359:931-935.
11. Go MF. Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16 Suppl 1:3-15.

12. Graham DY, Sung J. *Helicobacter pylori*. In: Feldman M., Friedman L.S., and Brandt L.J., eds. *Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management*. Volume 1. 8 ed. Philadelphia: Elsevier, 2006:1049-1066.
13. Jones NL, Shannon PT, Cutz E, Yeger H, Sherman PM. Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells early in the natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Pathol* 1997;151:1695-1703.
14. Moss SF, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 1996;38:498-501.
15. Cutler AF, Havstad S, Ma CK, Blaser MJ, Perez-Perez GI, Schubert TT. Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 1995;109:136-141.
16. Cruz-Correa M, Poonawala A, Abraham SC, Wu TT, Zahurak M, Vogelsang G, Kalloo AN, Lee LA. Endoscopic findings predict the histologic diagnosis in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Endoscopy* 2002;34:808-813.
17. McDonald GB., Sale GE. The human gastrointestinal tract after allogeneic marrow transplantation. In: Sale GI and Shulman HM, eds. *The Pathology of Bone Marrow Transplantation*. New York: Masson, 1984:83.
18. Yamaoka Y, Kikuchi S, el Zimaity HM, Gutierrez O, Osato MS, Graham DY. Importance of *Helicobacter pylori* *oipA* in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology* 2002;123:414-424.
19. Chen Y, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* colonization is inversely associated with childhood asthma. *J Infect Dis* 2008;198:553-560.
20. Reibman J, Marmor M, Filner J, Fernandez-Beros ME, Rogers L, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Asthma is inversely associated with *Helicobacter pylori* status in an urban population. *PLoS One* 2008;3:e4060.
21. Luther J, Dave M, Higgins PD, Kao JY. Association between *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease: a meta-analysis and systematic review of the literature. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1077-1084.
22. Chen Y, Blaser MJ. Inverse associations of *Helicobacter pylori* with asthma and allergy. *Arch Intern Med* 2007;167:821-827.
23. Correia-Silva JF, Neto Victoria JM, Guimaraes AL, de Sa AR, Gomes CC, de Almeida HC, Gomez RS. *Helicobacter pylori* in the oral mucosa of patients submitted to allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Braz Oral Res* 2006;20:191-195.
24. Au WY, Wong RW, Wong BC, Lie AK, Liang R, Leung AY, Kwong YL. Reduced incidence of acute graft versus host disease (GVHD) of the gut in Chinese carriers of *Helicobacter pylori* during allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Hematol* 2004;83:34-37.
25. el Zimaity HM, Segura AM, Genta RM, Graham DY. Histologic assessment of *Helicobacter pylori* status after therapy: comparison of Giemsa, Diff-Quik, and Genta stains. *Mod Pathol* 1998;11:288-291.

#### **4.1.2 Evaluación endoscópica y hallazgos histológicos en la enfermedad de injerto contra huésped**

*Velasco Guardado A<sup>1</sup>, López Corral L<sup>2</sup>, Álvarez Delgado A<sup>1</sup>, Flores Corral T<sup>3</sup>, Geijo Martínez F<sup>1</sup>, Caballero Barrigón D<sup>2</sup>, Rodríguez Pérez A<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup> Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitario de Salamanca. Salamanca. España.

<sup>2</sup> Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca. Salamanca. España.

<sup>3</sup> Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario de Salamanca. Salamanca. España.

**Rev Esp Enferm Dig 2012; 104: 308-312.**





## RESUMEN

Introducción: El tracto gastrointestinal es la diana principal de afectación en la Enfermedad de Injerto Contra Huésped (EICH). Su diagnóstico se basa en los hallazgos endoscópicos e histológicos. Hemos realizado un estudio retrospectivo, desde el 1 de enero de 1990 hasta el 30 de diciembre de 2008, de 338 endoscopías digestivas altas realizadas a 197 pacientes sometidos a trasplante alogénico de células hematopoyéticas con sospecha de EICH gastrointestinal. Resultados: Los hallazgos endoscópicos tienen una sensibilidad (S) del 34%, especificidad (E) del 65%, valor predictivo positivo (VPP) del 73% y valor predictivo negativo (VPN) del 48% para el diagnóstico de EICH. El estudio histológico de las biopsias tiene una S del 85,6%, E del 34,6%, VPP del 64,2% y VPN del 63,7%. El grado histológico se correlacionó con el grado clínico en la EICH aguda ( $p=0,0018$ ). Conclusión: la endoscopia digestiva alta es útil para el diagnóstico de EICH, ya que permite la toma de biopsias que finalmente pueden llevar al diagnóstico, pero con una rentabilidad limitada ya que los hallazgos histológicos tienen una sensibilidad y especificidad bajas, mientras que los endoscópicos son generalmente inespecíficos.

**Palabras Claves:** Enfermedad de Injerto Contra Huésped (EICH); Endoscopia;

Histología.

## INTRODUCCIÓN

El trasplante alogénico de células hematopoyéticas (TACH) es el tratamiento de elección en pacientes con enfermedades hematológicas malignas. Su realización se ha incrementado en los últimos años debido a un aumento en la edad de los receptores (mayores de 65 años) así como un mayor número de donantes no emparentados (más de 13 millones) además de que el cordón umbilical es considerado actualmente una fuente adecuada de células hematopoyéticas para pacientes adultos. La Enfermedad de Injerto contra Huésped (EICH) es la complicación más importante del trasplante alogénico y se asocia con una alta morbilidad y mortalidad (1). La EICH gastrointestinal se puede presentar como náuseas, anorexia, vómitos, diarrea, dolor abdominal, hemorragia o íleo, y conlleva un riesgo de mortalidad mayor del 80% cuando es grave (grados III y IV) y asocia una falta de respuesta a la primera línea de tratamiento (2). Se define la EICH aguda como la que aparece en los primeros 100 días post-trasplante (3). La EICH crónica se inicia a partir de los 100 días y es la causa más frecuente de muerte tras un trasplante alogénico en este periodo (4). El factor de riesgo más importante para padecer una forma crónica es padecer previamente una EICH aguda (5).

Debido a la alta frecuencia de síntomas gastrointestinales durante los primeros 100 días tras el trasplante, más del 50% de los pacientes trasplantados son sometidos a una endoscopia digestiva. Se debe realizar un diagnóstico diferencial entre EICH y otras situaciones como la toxicidad debida a la quimioterapia o la radioterapia, los efectos adversos farmacológicos, infecciones bacterianas, víricas, parasitarias o fúngicas (6; 7). Los hallazgos endoscópicos en la mucosa gástrica y duodenal varían entre mucosa normal y varios signos inespecíficos como el edema, eritema, úlceras francas y erosiones mucosas (8).

Los hallazgos histológicos, independientemente del área biopsiada, incluyen apoptosis de las células epiteliales de las criptas, destrucción de criptas e infiltración variable de linfocitos en el epitelio de la lámina propia (6; 9). Teniendo en cuenta los hallazgos endoscópicos, los síntomas inespecíficos y los posibles efectos adversos de los inmunosupresores usados en el tratamiento de la EICH, se requiere confirmación histológica antes de comenzar el tratamiento (10; 11).

Es esencial detectar precozmente la EICH, así como realizar un diagnóstico definitivo, de manera que se pueda prevenir un daño orgánico crónico irreversible y aumentar la supervivencia. Desafortunadamente, el diagnóstico de la EICH es difícil de establecer, debido en parte a la naturaleza no específica de los síntomas asociados, que necesita la exclusión de otros diagnósticos, tales como infección, efectos adversos farmacológicos, neoplasias o daño post-inflamatorio residual y habitualmente ocasiona un reto diagnóstico al hematólogo. Esta es la razón por la cual es necesaria la participación de un equipo multidisciplinar, incluyendo un gastroenterólogo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Hemos realizado un estudio retrospectivo de pacientes sometidos a un TACH en el Hospital Universitario de Salamanca entre el 1 de enero de 1990 y el 31 de diciembre de 2008 y que fueron remitidos a nuestro servicio para la realización de una endoscopia digestiva alta indicada por sospecha de EICH. Fueron recopilados retrospectivamente los hallazgos endoscópicos de dichas exploraciones, así como los hallazgos histológicos de las biopsias realizadas (al menos 3 biopsias) durante el procedimiento. Se utilizó la tinción estándar con hematoxilina y eosina. La presencia de cuerpos apoptóticos en la biopsia (criterio mínimo), abscesos crípticos y/o la destrucción de glándulas fueron

considerados criterios diagnósticos de EICH aguda o crónica, tras descartar otras causas que pudieran explicar estos hallazgos, tales como toxicidad farmacológica o infecciones mediante cultivos de sangre y heces, determinación de antigenemia para citomegalovirus o mediante la reducción de la dosis del fármaco sospechoso. Los hallazgos endoscópicos fueron estadificados de acuerdo a la clasificación propuesta por Cruz-Correa (12) (figura 1): estadio 0: normal; estadio I: pérdida del patrón vascular y/o eritema focal moderado; estadio II: edema y/o eritema difuso moderado; estadio III: edema, eritema, erosiones y/o sangrado; estadio IV: ulceraciones, exudados y/o sangrado.

En el análisis histológico, la presencia de cuerpos apoptóticos fue registrada como “compatible con EICH”. Los hallazgos histológicos fueron gradualmente estadificados de acuerdo con la clasificación propuesta por McDonald y Sales (13) en 1984: grado 0: normal; grado I: necrosis celular (apoptosis) de intensidad media sin pérdida de criptas; grado II: pérdida de una cripta aislada, abscesos crípticos glandulares, dilatación de las criptas glandulares, aplanamiento epitelial; grado III: pérdida de dos o más criptas glandulares contiguas; grado IV: descamación completa del epitelio.

En el análisis descriptivo de la muestra, se han utilizado porcentajes para las variables cualitativas y medidas de tendencia central (media y/o mediana si existía una gran asimetría o dispersión) y dispersión (desviación estándar) para variables cuantitativas. Hemos utilizado para el análisis estadístico el programa SPSS v. 15.0 (Chicago, Illinois, USA). Todas las variables dicotómicas fueron analizadas con el test de  $\chi^2$ , las variables continuas y categóricas con el test de ANOVA y para las correlaciones el coeficiente de correlación de Pearson.

## RESULTADOS

Las características basales del grupo estudiado así como los hallazgos endoscópicos e histológicos se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Características basales del grupo de estudio así como los hallazgos endoscópicos e histológicos.

Pacientes <i>N</i>	197
Masculino <i>N (%)</i>	119 (60.2)
Femenino <i>N (%)</i>	78 (39.8)
Media de edad, años ( <i>Standard Deviation</i> )	45.3 (14)
Estudios endoscópicos <i>N</i>	379
Gastroskopias <i>N (%)</i>	338 (89.2)
Primeros 100 días	223 (66)
<i>Pacientes con EICH N (%)</i>	135 (68.5)
<i>EICH aguda gastrointestinal N (%)</i>	98 (49.7)
Leve	24 (24.5)
Moderada	56 (57.1)
Grave	18 (18.4)
<i>EICH crónica gastrointestinal (%)</i>	90 (45.6)
Leve	29 (32.2)
Moderada	46 (51.1)
Grave	14 (15.6)
<i>EICH aguda y crónica gastrointestinal N (%)</i>	53 (26.9)
<i>Grados endoscópicos de gravedad N (%)</i> *	
Grado 0	160 (65.8)
Grado I	34 (14)
Grado II	21 (8.6)
Grado III	20 (8.2)
Grado IV	8 (3.3)
<i>Grados histológicos de los pacientes con EICH aguda N(%)</i> ^	
Grado I	48 (48)
Grado II	29 (29.6)
Grado III	18 (18.4)
Grado IV	0

\* Según la clasificación propuesta por Cruz-Correa (12).

^ Según la clasificación propuesta por McDonald y Sales (13).

## DIAGNÓSTICO ENDOSCÓPICO DE EICH

Trescientos treinta y ocho endoscopias digestivas altas fueron realizadas en 197 pacientes con sospecha de EICH aguda o crónica. Sólo 83 pacientes con EICH presentaban datos endoscópicos compatibles con EICH (34.2%). Por otro lado, 30 pacientes (35,3%) presentaban signos endoscópicos de EICH a pesar de que posteriormente no se confirmó el diagnóstico de EICH ni histológica ni clínicamente. La sensibilidad (S) de los hallazgos endoscópicos para el diagnóstico de EICH es del 34%, la especificidad (E) del 65%, el valor predictivo positivo (VPP) del 73% y el valor predictivo negativo (VPN) del 48%.

Los hallazgos endoscópicos clasificados según la clasificación de gravedad de Cruz-Correa (12) no se relacionó con la gravedad clínica.

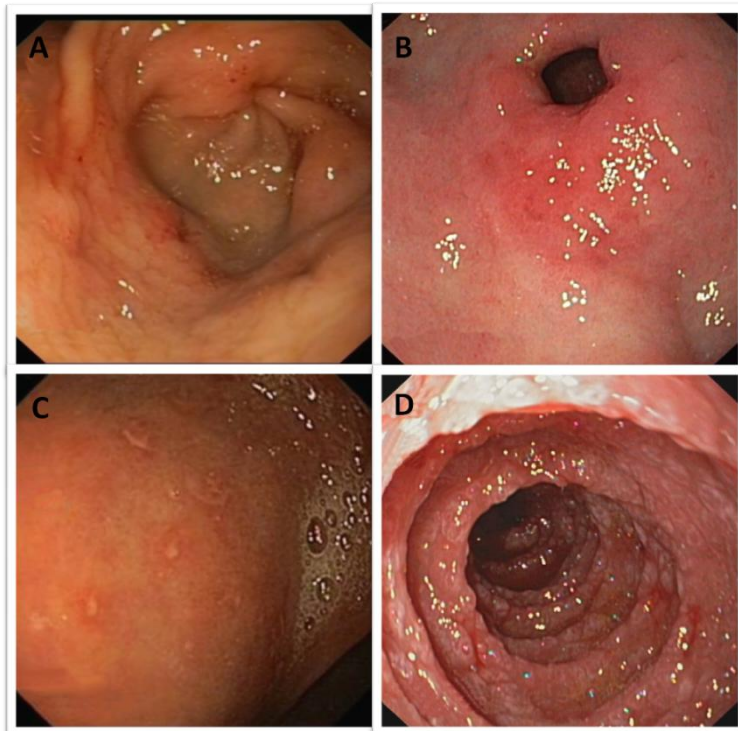


Figura 1: Hallazgos endoscópicos según la clasificación propuesta por Cruz-Correa (12): A) Antro gástrico. Grado I; B) Antro gástrico. Grado II; C) Cuerpo gástrico. Grado III; D) Duodeno. Grado IV.

## HISTOLOGÍA

Se realizó biopsia en 331 de las 338 endoscopias digestivas altas (98%). El esófago se biopsió en 19 exploraciones (7.8%), el estómago en 324 (92.2%) y el duodeno en 18 (7.4%). Las biopsias de estómago presentaron una S=89%, E=30.6%, VPP=63.8% y VPN=67%. En el esófago, S=33.3%, E=100%, VPP=100% y VPN=41%, y en duodeno S=80%, E=62.5%, VPP=57% and VPN=83.3%. Al juntar todas las localizaciones, S=85.6% E=34.6% VPP=64.2% and VPN=63.7%.

La gravedad histológica según la clasificación propuesta anteriormente se correlacionó con la gravedad clínica ( $p=0.018$ ) con una  $r$  de Pearson de 0,24 ( $p=0.006$ ).

La gravedad histológica no se asoció con los hallazgos endoscópicos según la clasificación de Cruz-Correa (12).

## COMPLICACIONES

La incidencia de hemorragia digestiva tras la realización de biopsia fue del 2% ( $n=4$ ).

La hemorragia fue leve en tres casos y moderada en un caso que requirió técnicas endoscópicas para su control.

## DISCUSIÓN

### EICH Y ENDOSCOPIA

La EICH intestinal es una complicación frecuente del TACH; más del 50% de los pacientes trasplantados son remitidos a la Unidad de Endoscopias con el objeto de confirmar el diagnóstico de EICH. A pesar de que es necesaria confirmación histológica para establecer el diagnóstico, una correcta interpretación macroscópica es esencial de cara a iniciar el tratamiento a ser posible el día de realización de la endoscopia.

Nuestros resultados muestran que el diagnóstico basado en los hallazgos endoscópicos es pobre, con un elevado porcentaje de falsos positivos y negativos, y que estos

hallazgos endoscópicos no se relacionan con la gravedad clínica. En un estudio retrospectivo en el cual se les realizó gastroscopia con biopsia a pacientes con sospecha de EICH (11), no encontraron diferencias con respecto a los hallazgos endoscópicos o los síntomas entre los pacientes que posteriormente fueron diagnosticados de EICH y los que no. En este estudio, el 18% de los pacientes con histología compatible con EICH presentaban una endoscopia normal.

No conocemos cual es la mejor zona del tracto gastrointestinal para tomar biopsias. (14). Lo más razonable sería tomar la biopsia según los síntomas predominantes (15). Thomson y colaboradores (14) llevaron a cabo un estudio prospectivo con 24 pacientes en 2006, en el cual realizaron gastroscopia (con toma de biopsias gástricas y duodenales), colonoscopia (con biopsias de colon izquierdo y derecho) e ileoscopia (con biopsias de ileon terminal) en pacientes trasplantados que comenzaron con diarrea en los primeros 100 días tras el trasplante. Obtuvieron una tasa mayor de diagnóstico en las biopsias tomadas en colon izquierdo (82%), comparado con el 77% obtenido en el colon derecho, 68% en el ileon, 65% en duodeno y 71% en antro. La combinación de colonoscopia más ileoscopia y colonoscopia más gastroscopia mostraban los mayores porcentajes de biopsias positivas (95% y 94%, respectivamente).

En 2008, Ross y colaboradores realizaron un estudio prospectivo de 112 pacientes que fueron sometidos simultáneamente a biopsia de estómago, duodeno y colon recto-sigmoide para el diagnóstico de EICH gastrointestinal y obtuvieron que las biopsias tomadas de recto-sigma conseguían los mayores porcentajes de diagnóstico de EICH con respecto a sensibilidad, especificidad, VPP y VPN en comparación con otras localizaciones (95,6%, 100%, 100% y 84%, respectivamente). La sensibilidad de las biopsias gástricas y duodenales fueron 72,5% ( $p < 0.00001$ ) y 79,2% ( $p = 0.0018$ ) respectivamente, mientras que el VPN fue del 45,6% para el estómago ( $p = 0.0039$ ) y



52,5% ( $p=0.02$ ) para el duodeno (7). Nuestros resultados se asemejan a estos, con una sensibilidad global del 85,6%, pero con un bajo VPN (63,7%).

## HISTOLOGÍA Y EICH

La interpretación anatomopatológica de los estadios I y II en el periodo postoperatorio no está exenta de dificultades (16). En primer lugar, los cambios histológicos inducidos por la terapia citorreductora antes del trasplante, pueden imitar una EICH. Estos cambios, que son secundarios a toxicidad farmacológica, generalmente tiene lugar en los primeros 20 días tras el trasplante, aunque se han descrito casos más allá del día 30 (17; 18). Las infecciones en el periodo post-trasplante (bacterianas, fúngicas, parasitarias y virales) son también un problema, ya que pueden producir signos y síntomas similares a la EICH, especialmente la infección por citomegalovirus (19).

Cheung y colaboradores (20) publicaron un estudio retrospectivo en 2008 en el cual compararon los hallazgos histológicos y endoscópicos de 101 pacientes. Los hallazgos endoscópicos revelaron una relación estadística positiva con las alteraciones histológicas (OR=33,6; 95% CI: 4,3-261,1).

En 1994, un estudio encontró una diferencia gradual entre 0 y 1 estadio entre las clasificaciones histológica y endoscópica (macroscópica) en la EICH aguda en el 87.6% de las endoscopias (21). Sin embargo, un estudio más reciente (14) encontró una diferencia de 2 a 4 estadios en el 28,2% de las biopsias en comparación con el estudio endoscópico. En este estudio, se obtuvo un diagnóstico histológico de EICH agudo en el 44,7% de biopsias de áreas normales endoscópicamente, lo que indica la necesidad de realizar biopsias de zonas de mucosa aparentemente normal. Estos autores consideran que el estadio histopatológico no es útil para graduar la gravedad de la EICH y aseguran que los factores predictivos de respuesta y mortalidad en relación con la EICH

deberían basarse en criterios clínicos. En nuestro estudio, el 65,8% de los pacientes con EICH tenían una endoscopia normal.

Por otro lado, un reciente estudio de 27 pacientes con EICH (determinado a partir de biopsias colónicas) mostró que los pacientes con grados histológicos III y IV, comparados con los grados I y II, no solo presentan más síntomas ( $p=0,01$ ), si no que requieren más frecuentemente segunda línea de tratamiento secundario a corticorrefratariedad ( $p=0,027$ ) y presentan una mortalidad mayor asociada a complicaciones relacionadas con la EICH ( $p=0,05$ ) (22). Estos hallazgos son compatibles con nuestros resultados, ya que obtenemos una correlación positiva entre el grado histológico y la gravedad clínica ( $r$  de Pearson= $0,24$ ;  $p=0,006$ ), pero sin embargo esta relación no se establece con la afectación endoscópica.

Concluimos que la endoscopia digestiva alta es útil para el diagnóstico de EICH, ya que permite la toma de biopsias que finalmente pueden llevar al diagnóstico, pero con una rentabilidad limitada ya que los hallazgos histológicos tienen una sensibilidad y especificidad bajas, mientras que los endoscópicos son generalmente inespecíficos. Es necesario realizar biopsias de zonas de mucosa aparentemente normal, ya que en un alto porcentaje de casos se consigue realizar diagnóstico histológico de EICH.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol* 2007;25:139-170.
2. Leisenring WM, Martin PJ, Petersdorf EW, Regan AE, Aboulhosn N, Stern JM, Aker SN, Salazar RC, McDonald GB. An acute graft-versus-host disease activity index to predict survival after hematopoietic cell transplantation with myeloablative conditioning regimens. *Blood* 2006;108:749-755.
3. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009;373:1550-1561.
4. Lee SJ, Klein JP, Barrett AJ, Ringden O, Antin JH, Cahn JY, Carabasi MH, Gale RP, Giralt S, Hale GA, Ilhan O, McCarthy PL, Socie G, Verdonck LF, Weisdorf DJ, Horowitz MM. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood* 2002;100:406-414.
5. Carlens S, Ringden O, Remberger M, Lonnqvist B, Hagglund H, Klaesson S, Mattsson J, Svahn BM, Winiarski J, Ljungman P, Aschan J. Risk factors for chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: a retrospective single centre analysis. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:755-761.
6. Cox GJ, Matsui SM, Lo RS, Hinds M, Bowden RA, Hackman RC, Meyer WG, Mori M, Tarr PI, Oshiro LS. Etiology and outcome of diarrhea after marrow transplantation: a prospective study. *Gastroenterology* 1994;107:1398-1407.
7. Ross WA, Ghosh S, Dekovich AA, Liu S, Ayers GD, Cleary KR, Lee JH, Couriel D. Endoscopic biopsy diagnosis of acute gastrointestinal graft-versus-host disease: rectosigmoid biopsies are more sensitive than upper gastrointestinal biopsies. *Am J Gastroenterol* 2008;103:982-989.
8. Fallows G, Rubinger M, Bernstein CN. Does gastroenterology consultation change management of patients receiving hematopoietic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant* 2001;28:289-294.
9. Ponc R, Hackman RC, McDonald GB. Endoscopic and histologic diagnosis of intestinal graft-versus-host disease after marrow transplantation. *Gastrointest Endosc* 1999;49:612-621.
10. Bombi JA, Nadal A, Carreras E, Ramirez J, Munoz J, Rozman C, Cardesa A. Assessment of histopathologic changes in the colonic biopsy in acute graft-versus-host disease. *Am J Clin Pathol* 1995;103:690-695.
11. Roy J, Snover D, Weisdorf S, Mulvihill A, Filipovich A, Weisdorf D. Simultaneous upper and lower endoscopic biopsy in the diagnosis of intestinal graft-versus-host disease. *Transplantation* 1991;51:642-646.
12. Cruz-Correa M, Poonawala A, Abraham SC, Wu TT, Zahurak M, Vogelsang G, Kalloo AN, Lee LA. Endoscopic findings predict the histologic diagnosis in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Endoscopy* 2002;34:808-813.

13. McDonald GB., Sale GE. The human gastrointestinal tract after allogeneic marrow transplantation. In: Sale GI and Shulman HM, eds. *The Pathology of Bone Marrow Transplantation*. New York: Masson, 1984:83.
14. Thompson B, Salzman D, Steinhauer J, Lazenby AJ, Wilcox CM. Prospective endoscopic evaluation for gastrointestinal graft-versus-host disease: determination of the best diagnostic approach. *Bone Marrow Transplant* 2006;38:371-376.
15. Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med* 2003;54:29-52.
16. Nguyen CV, Kastenberg DM, Choudhary C, Katz LC, DiMarino A, Palazzo JP. Is single-cell apoptosis sufficient for the diagnosis of graft-versus-host disease in the colon? *Dig Dis Sci* 2008;53:747-756.
17. Sloane JP, Norton J. The pathology of bone marrow transplantation. *Histopathology* 1993;22:201-209.
18. Snover DC. Graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract. *Am J Surg Pathol* 1990;14 Suppl 1:101-108.
19. Snover DC. Mucosal damage simulating acute graft-versus-host reaction in cytomegalovirus colitis. *Transplantation* 1985;39:669-670.
20. Cheung DY, Kim JI, Kim SS, Sung HY, Cho SH, Park SH, Han JY, Kim JK, Lee JW, Min WS, Park GS, Kang CS. Endoscopic evaluation in gastrointestinal graft-versus-host disease: comparisons with histological findings. *Dig Dis Sci* 2008;53:2947-2954.
21. Kreisel W, Fauser AA, Dolken G, Herbst EW. [Gastroenterologic findings in graft versus host disease after allogenic bone marrow transplantation]. *Z Gastroenterol* 1991;29:289-293.
22. Melson J, Jakate S, Fung H, Arai S, Keshavarzian A. Crypt loss is a marker of clinical severity of acute gastrointestinal graft-versus-host disease. *Am J Hematol* 2007;82:881-886.

#### ***4.1.3 Potential protective effect of Helicobacter pylori on the development of gastrointestinal Graft versus Host Disease***

***Antonio Velasco -Guardado<sup>1</sup>, Ana Mora-Soler<sup>1</sup>, Lucía López-Corral<sup>2</sup>, Oriana López-Godino<sup>2</sup>, Lourdes Vázquez-López<sup>2</sup>, Oscar Blanco-Muñoz<sup>3</sup>, Estefanía Pérez-López<sup>2</sup>, Antonio Rodríguez-Pérez<sup>1</sup>, Dolores Caballero-Barrigón<sup>2</sup>.***

<sup>1</sup> Department of Gastroenterology.

<sup>2</sup> Department of Hematology.

<sup>3</sup> Department of Pathology.

University Hospital of Salamanca.

*Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL). Salamanca. Spain.*

**En proceso de publicación.**



## RESUMEN

Estudios recientes otorgan al *Helicobacter Pylori* (HP) una capacidad moduladora sobre la respuesta inmune con un aumento de las células T reguladores en la mucosa gástrica que podría prevenir una respuesta Th1/Th17. A pesar de que HP no está considerado como parte de la flora bacteriana habitual, presenta cierta capacidad inmunomoduladora. Nuestra hipótesis consiste en demostrar en un estudio prospectivo que la infección por HP podría tener un efecto protector contra el desarrollo de la EICH aguda gastrointestinal en pacientes que reciben un TACH. Se determinó la infección por HP previa al trasplante mediante test de aliento con C<sup>13</sup>. Tras el TACH, todos los pacientes con síntomas compatibles con EICH gastrointestinal fueron sometidos a una endoscopia digestiva alta con toma de biopsias. Se incluyeron 79 pacientes en el estudio. El 93,7% de los pacientes recibió un TACH de sangre periférica y en más del 50% el donante no fue emparentado. Se diagnosticó EICH gastrointestinal agudo en el 51,9% (n=41). Mediante análisis multivariante, la infección por HP se asoció con una menor frecuencia de EICH agudo gastrointestinal (OR=0.19 (95% CI: 0.05-0.67) mientras que, por el contrario, los pacientes con donante no emparentado y los regímenes mieloablativos se asociaron con una mayor frecuencia de EICH gastrointestinal. La supervivencia global fue del 74%. Mediante análisis multivariante con regresión de Cox, las variables que se asociaron a una mayor supervivencia global fueron la gravedad clínica (HR=0,19); el acondicionamiento de intensidad reducida (HR=0,04) y la profilaxis de EICH con Tacrolimus-Sirolimus (HR=0,06). Este es el primer estudio prospectivo que sugiere que la infección por HP podría jugar un papel importante en el descenso de la incidencia de la EICH gastrointestinal en pacientes que reciben un TACH de sangre periférica y de donante emparentado o no emparentado.

## **ABSTRACT**

Previous reports ascribe a modulating capacity of the immune response to *Helicobacter Pylori* (HP), with an increase in regulatory T cells of the gastric mucosa that might prevent a Th1/Th17 response. Although HP is not considered as part of the normal bacterial flora, it has some immunomodulatory capacity. Our hypothesis was to demonstrate in a prospective study that HP infection pretransplant could have a protective effect against development of acute gastrointestinal graft versus host disease (GVHD) in patients receiving allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT). Presence of HP before transplant was determined using C<sup>13</sup> urea breath test. After HCT, all patients with gastrointestinal symptoms consistent with gastrointestinal GVHD underwent esophagogastro-duodenoscopy with biopsy. Seventy-nine patients receiving an allogeneic HCT were included. 93.7 % of them received peripheral blood stem cell and in 51.9 % donor was unrelated. Acute gastrointestinal GVHD was diagnosed in 51.9% (n = 41). In the multivariable analysis, HP infection was associated with a lower frequency of gastrointestinal GVHD (OR=0.19 (95% CI: 0.05-0.67); in contrast, an unrelated donor was associated with a higher frequency of gastrointestinal GVHD (OR=5.4 (95% CI: 1.6-18.2). One year overall survival (OS) was 74%. In the multivariate Cox Proportional-Hazards regression analysis, clinical severity of acute GVHD (HR=0.19), reduced intensity conditioning (HR=0.04) and Tacrolimus-Sirolimus GVHD prophylaxis (HR=0.06) were all associated with a better OS. This is the first prospective study suggesting that HP infection could play a role in decreasing acute gastrointestinal GVHD in patients receiving allogeneic HCT from peripheral blood from related and unrelated donors.

## **KEY POINT**

*Helicobacter pylori* infection and its protective role on acute gastrointestinal graft vs. host disease.



## INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic cell transplant (HCT) is the treatment of choice in many malignant and non malignant diseases; unfortunately, the risk of mortality is still significant with a transplant-related mortality (TRM) ranging between 10 and 50% depending on the patient, donor and disease characteristics: both TRM and morbidity are related to the development of graft versus host disease (GVHD)<sup>1,2</sup>. Acute gastrointestinal GVHD is characterized by nausea, anorexia, vomiting, diarrhea, abdominal pain, bleeding and ileus. In its most severe forms GVHD has a mortality risk greater than 80%<sup>3</sup>.

*Helicobacter pylori* (HP) is a gram-negative bacillus that has been related to peptic ulcers, gastric cancer and MALT lymphoma. HP infection is acquired during childhood and remains present throughout an individual's entire life, although inducing symptoms only appear in a subset of patients<sup>4,5</sup>. The prevalence of HP infection varies between 20-30% in some developed countries and 60-80% in other ethnic groups and developing countries<sup>6</sup>. HP not only colonizes the gastric mucosa. The presence of HP has been described in small bowel and colon in addition to many other extraintestinal sites<sup>7</sup>. Chronic HP infection has also been related to several non-gastrointestinal diseases<sup>8,9</sup>. Because of its ability to elicit a chronic immune response in the host, studies have suggested a possible role for HP in the development of autoimmune diseases<sup>10</sup>. HP can produce endoscopic findings similar to those caused by gastric GVHD, and histological analysis may reveal apoptotic bodies<sup>11,12</sup>. Diagnostic of HP infection is made by either a urea breath test (sensitivity and specificity up to 90%)<sup>13</sup> or mucosal biopsy and histological examination (sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of 100%, 66%, 84% and 100%, respectively)<sup>14</sup>.

In 2011, we reported a retrospective study analysing the impact on HP infection on the prevalence of GVHD on 198 patients receiving an allogeneic HCT. The principal finding was that HP infection was associated with a decrease prevalence of intestinal GVHD development<sup>15</sup>. We now report our results from a prospective study of patients whose HP infection state was determinate before transplant. The hypothesis to be tested was that pre-HCT HP infection was associated with a lower frequency of gut GVHD than in HP-non-infected patients.

## **MATERIALS AND METHODS**

This study was approved by the Ethical Clinical Research Committee of the University Hospital of Salamanca, Spain.

### **PATIENTS SELECTION**

This prospective study included consenting adult patients referred to our transplant Unit to receive an allotransplant, regardless of indication, from September 2012 to February 2015. Patients less than 18 and with proton pump inhibitors in the last 2 weeks before the performance of a breath test were excluded.

### **STUDY DESIGN**

Before conditioning for HCT, patients were evaluated for a peptic ulcer, HP eradication treatments and presence of HP using C<sup>13</sup> urea breath test (UBTest<sup>®</sup> Otsuka Pharmaceutical, Spain). After HCT, all patients with gastrointestinal symptoms consistent with gastrointestinal GVHD underwent esophagogastro-duodenoscopy with biopsy. A second HP C<sup>13</sup> urea breath test was performed in patients who did not develop symptoms within the first 100 days after HCT.

Clinical variables, endoscopic and histological findings were collected prospectively. Biopsy specimens were sectioned and stained with hematoxylin and eosin. Diagnosis of acute GVHD was established and graded according to the Seattle-Glucksberg modified

criteria<sup>16,17</sup> in grade 0 to IV by history, endoscopic appearance and histology, once other possible processes (such as infections or drug toxicity) were ruled out. A HP infection was defined as a positive breath test or HP bacillus was seen in the histological analysis of gastric mucosa. A non-HP case was defined as at least two negative results (breath test and/or biopsy). No HP treatment was indicated before, during or after HCT. The minimum follow-up of patients was 100 days.

#### ENDOSCOPIC AND HISTOLOGIC SCORING

Endoscopic findings were staged according to the classification proposed by Cruz-Correa<sup>18</sup>: Stage 0: Normal; Stage I: loss of vascular pattern and/or focal moderate erythema; Stage II: oedema and/or diffuse moderate erythema; Stage III: oedema, erythema, erosions and/or bleeding; Stage IV: Ulceration, exudates and/or bleeding. In the histological analysis, the presence of apoptotic bodies was considered to be “consistent with GVHD”, with staging according to the classification proposed by Washington et al<sup>19</sup>: Grade 0: normal; Grade I: Isolated apoptotic epithelial cells without crypt loss; Grade II: Loss of isolated crypts without the loss of contiguous crypts; Grade III: Loss of 2 or more contiguous crypts; Grade IV: Extensive crypt loss with mucosal denudation.

#### STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was carried out with SPSS v. 15.0 (Chicago, Illinois, USA). Percentages were used for categorical variables, while mean and/or median and standard deviation (SD) were used for continuous variables. All dichotomous variables were analyzed with  $\chi^2$  contingency tests in order to compare the frequencies of categorical variables, or, where appropriate, Fisher’s exact test and Monte Carlo simulations. Ninety-five percent confidence intervals for odds ratio were derived. Continuous and categorical variables were analyzed with ANOVA. Multivariate logistic regression was

used to analyse confounding factors. We used Cox Proportional-Hazards regression, Kaplan-Meier estimator and Log-rank test for survival analysis. Statistical significance was defined at the  $p < 0.05$  level.

## RESULTS

### DESCRIPTIVE ANALISYS

Of 120 adult patients who received an allogeneic HTC at our Unit in that period, 85 were eligible for this study and 79 were finally included. Baseline characteristics of the study group are summarized in Table 1. The mean follow-up of patients was 195 days (range: 125-292). Although the overall HP infection rate was 34.2% (n = 27), only 3 patients had a previous ulcer history and 6 had received HP therapy. Gastroscopy was performed after HCT in 60 patients (76%) for symptoms consistent with GVHD. The predominant symptoms were anorexia, nausea and vomiting (upper) in 24 patients (40%), diarrhea (lower) in 25 patients (42%) and 11 patients with nausea, vomiting and diarrhea (upper and lower). According to the classification proposed by Cruz-Correa<sup>18</sup>, 30 patients (49.7%) had endoscopic stage 0-I, twenty patients (33.3%) stage II and 10 patients stage III (17%). Histological findings were: 29.5% (n=18) grade 0; 52.5% grade I (n=32); 8.2% grade II (n=5), 9.8% grade III (n=6).

Table 1: Baseline characteristics of the study group.

	n (Valid percentage)
<i>Patients</i>	79
<i>Sex</i>	
Men	42 (53.2)
Women	37 (46.8)
<i>Diagnosis</i>	
Acute myelogenous leukemia	30 (38.5)
Myelodysplastic syndrome	12 (15.2)
Acute lymphocytic leukemia	8 (10.3)

Lymphoma	14 (18)
Others	15 (17.1)
<hr/>	
<i>Mean age, years (standard deviation)</i>	47.4 (14.3)
<hr/>	
<i>Type of donor</i>	
Related	38 (48.1)
Unrelated	41 (51.9)
HLA 10/10 matched	53 (67.1)
HLA haploidentical	11 (13.9)
HLA mismatched	15 (19.1)
<hr/>	
<i>Source of progenitor cells</i>	
Peripheral blood	74 (93.7)
Bone marrow	3 (3.8)
Cord Blood	2 (2.5)
<hr/>	
<i>Type of conditioning</i>	
Reduced intensity	49 (62)
Myeloablative	30 (38)
ATG	9 (11.4)
<hr/>	
<i>Donor recipient gender mismatch</i>	47 (59.5)
<hr/>	
<i>ABO major incompatibility</i>	14 (17.9)
<hr/>	
<i>GVHD prophylaxis*</i>	
Tacrolimus + Sirolimus	39 (49.4)
Tacrolimus + MTX	26(32.9)
Tacrolimus/CSP + MMF	14 (17.7)
<hr/>	
<i>Pretransplant donor/host CMV IgG serology</i>	
+/+	38 (50)
+/-	23 (30.3)
-/+	9 (11.8)
-/-	6 (7.9)

\* CSP = cyclosporine, MTX = methotrexate, MMF = mycophenolate mofetil.

The overall rate of acute GVHD (gastrointestinal, skin or liver) was 69.6% (n = 55). The overall grades of patients with acute GVHD were: 29.1% grade I, grade II in 40%, grade III in 20% and grade IV 10.9%. There was gastrointestinal involvement in 51.9% (n = 41), skin involvement in 45.6% (n = 36) and liver involvement in 8.9% (n = 7). Regarding gastrointestinal GVHD, diagnosis was made at a mean of 35 days post-transplantation (Range: 6-130). Four patients developed late acute GVHD over 100

days post-HCT (+106, +111, +122, +130). Clinical gastrointestinal GVHD grade was: 27 patients (67.5%) had peak grade I-II and the remaining 32.5% a moderate form (grade III). None of the patients had a grade IV gut GVHD. Regarding GVHD outcome, first line treatment included: topical treatment with beclomethasone dipropionate and budesonide in 18 patients (44%), systemic treatment with prednisone 1-2 mg/kg in 9 (22%) and both topical and systemic in 14 patients (34%). The rate of response to this first line therapy was 87.8% (n= 36).

#### RISK FACTORS FOR THE DEVELOPMENT OF GASTROINTESTINAL GVHD: UNIVARIATE ANALYSIS

To test the hypothesis that HP infection was associated with a lower frequency of gut GVHD, we compared the frequency of baseline HP infection in patients with GVHD (10/41, 24%) and without GVHD (17/38, 45%) (p=0.05). Other significant factors related to the frequency of gastrointestinal GVHD by univariate analysis included patient female sex (decreased GI GVHD frequency), unrelated donor (increased GVHD frequency), and myeloablative conditioning (increased GVHD frequency) (Table 2).

We conducted a stratified analysis for the association between HP infection and GVHD in order to detect potential confounders. Unrelated donor was significantly more frequent in HP positive than in HP negative patients (66% and 34 % respectively) (p=0.048). HP infection was not associated with the development of acute skin or liver GVHD or with clinical severity or histological grade of gastrointestinal GVHD. HP infection was not associated with the location of the symptoms (upper or lower) in the acute gastrointestinal GVHD.

Table 2: Univariate analysis of the variables related with the development of acute gastrointestinal GVHD.

Variables	Patient with GVHD N= 41 (51.9%)	Patients without GVHD N= 38 (48.1%)	p
<i>Sex (women)</i>	16 (43.2)	21 (56.8)	0.14
<i>Mean age, years (standard deviation)</i>	48 (13.1)	46 (13.6)	0.60
<i>Type of donor (Unrelated)</i>	27 (65.9)	14 (36.8)	0.01
<i>Type of conditioning (Myeloablative)</i>	19 (63.3)	11 (36.7)	0.11
<i>Donor recipient gender mismatch (yes)</i>	23 (62.2)	24 (60)	0.84
<i>ABO major incompatibility (yes)</i>	10 (24.4)	4 (10.5)	0.10
<i>GVHD prophylaxis (Tacrolimus + Sirolimus)</i>	17 (43.6)	22 (56.4)	0.14
<i>GVHD prophylaxis (Tacrolimus + MTX)</i>	17 (65.4)	9 (34.6)	0.09
<i>GVHD prophylaxis (Tacrolimus/CSP + MMF)</i>	7 (17.1)	7 (18.4)	0.87
<i>Helicobacter pylori infection (yes)</i>	10 (24.4)	17 (44.7)	0.05

#### RISK FACTORS FOR THE DEVELOPMENT OF GASTROINTESTINAL GVHD: MULTIVARIATE ANALYSIS

In the multivariate model using binary logistic regression to identify factors which might be associated with the development of acute gastrointestinal GVHD, we included age, sex, type of conditioning, donor type (related / unrelated), donor recipient gender mismatch, ABO major incompatibility and type of GVHD prophylaxis. There was an interaction between the terms HP infection and patient female sex. In a multivariable model, HP infection and patient female sex were independently associated with a lower frequency of GI GVHD (OR=0.19 (95% CI: 0.05-0.67) and OR=0.028 (95% CI: 0.08-0.87), respectively). An unrelated donor and myeloablative conditioning were associated with a higher frequency of GI GVHD (Table 3).

Table 3: Significant variables related to the development of acute gastrointestinal GVHD after a multivariate analysis using binary logistic regression.

Variables	p	OR (95% CI)
<i>Helicobacter pylori</i> infection (yes)	0.010	0.19 (0.05-0.67)
Sex (Women)	0.028	0.2 (0.08-0.87)
Type of donor (Unrelated)	0.007	5.4 (1.60-18.2)
Type of conditioning (Myeloablative)	0.05	3.3 (0.98-11.3)

## SURVIVAL ANALISYS

With a median follow up of 232 days (range: 139-320) for patients alive, 5 patients (6.3%) have died due to relapse and 15 patients (19%) due to non-relapse mortality; in 11 of them the cause of dead was GVHD related (73%). The other four patients died, one due infectious complication and three due to sinusoidal obstruction syndrome. One year overall survival (OS) is 74%. Regarding variables influencing overall survival, in the Univariate analysis, related donor (p=0.04), Reduced Intensity Conditioning (p=0.01), no acute GVHD (p=0.04) or grades 0-II GVHD (p<0.001) were all associated with a better OS. The variables that obtain statistical significance in the Cox Proportional-Hazards regression were clinical severity of GVHD (no GVHD or mild GVHD associated with a better OS) (HR=0.19 (95% CI: 0.06-0.57)), Reduced Intensity Conditioning (HR=0.04 (95% CI: 0.006-0.32)) and Tacrolimus-Sirolimus GVHD prophylaxis (HR=0.06 (95% CI: 0.01-0.54)).

## DISCUSSION

Recent studies suggest that the bacteriological status of the patients receiving allogeneic HCT impacts the risk of developing gastrointestinal GVHD<sup>20</sup>, especially when it concerns the intestinal flora. Multiple studies propose that an appropriate bacteriological status with a good diversity of bacterial colonizing the digestive tract, may cause an immune modulation that protects against development of gastrointestinal GVHD<sup>21-23</sup>. Although HP is not considered as part of the normal bacterial flora because of its known



injurious potential, we know that it has some immunomodulatory capacity. Laboratory tests ascribe a modulating capacity of the immune response to HP, with an increase in the regulatory T cells of the gastric mucosa that might modify the immune response and prevent a Th1/Th17 response<sup>11,12</sup>. In HP infected human gastric mucosa, an enhanced expression of Indoleamine 2, 3-dioxygenase is capable of modulating Th1/Th2 and Th17 pathways. This mechanism lowers gastric inflammation, possibly contributing to the persistence of HP<sup>24</sup>. Chen and Blaser<sup>25</sup> suggest that the intensity of the response of the host against especially aggressive HP strands (with the *cagA* gene) might alter the pattern of the Th1/Th2 immune response with the subsequent induction of immunoregulating lymphocytes that may prevent immune hyper-reactivity responses, such as asthma or allergy in cases where the Th2 pattern is predominant.

It is very well known that intensity of total body irradiation and chemotherapy used during conditioning dictated the integrity of the gastrointestinal mucosa and the subsequent transfer of bacterial lipopolysaccharide and other “danger/pathogen-associated molecular patterns” (DAMPs/PAMPs) into the systemic circulation. These molecules activate TNF and interleukins 1 and 6<sup>26-28</sup> and recipient antigen-presenting cells (APCs)<sup>29</sup> stimulating donor T cells<sup>30,31</sup> and generating tissue inflammation, allowing the access of T cells to GVHD target tissue<sup>32</sup>. The impact of HP in decreasing acute GVHD could be due to its capacity in promoting an increase of T regulator cells on gastrointestinal tissue<sup>11,12,25</sup>; moreover increasing Tregs is associated with a reduced GVHD incidence<sup>33</sup>.

Recent meta-analysis suggests that colonization by HP might protect against the development of certain autoimmune disorders, such as asthma<sup>8,34</sup> and atopic dermatitis<sup>9</sup>. Particularly, *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein has been shown to act as an immune modulating agent to suppress Th2 responses in ovalbumin-induced allergic

asthma and *Trichinella spiralis* infection<sup>35,36</sup>. We should emphasize the negative association that has been established in several studies between inflammatory bowel disease (IBD) and HP infection with a significant relative risk lower than 1 in a recent meta-analysis<sup>37</sup>. Thirteen of the studies of this meta-analysis found a relative risk higher than 1. The authors concluded that these results suggest that HP infection might have a beneficial effect in the development of IBD.

Regarding relationship between HP infection and GVHD, two prospective and one retrospective studies have been published until now. Whereas in the Correia-Silva et al<sup>38</sup> paper no relationship between HP infection and the development of GVHD was observed in 46 patients who received an allogeneic transplant, our group reported in a retrospective study<sup>15</sup> with 198 patients that HP infection had a negative modulating effect on the development of acute GVHD (RR=0.60 (95% CI: 0.46-0.79) p=0.001) and chronic GVHD (RR=0.75; (95% CI: 0.61-0.92) p=0.016). Furthermore, the presence of HP was inversely correlated with the histological severity of GVHD (p=0.003). Based on that study, we try to demonstrate in a prospective study our hypothesis of the prospective role of HP infection on the appearance of intestinal acute GVHD. In this prospective study with 79 available patients, we again observe that in patients undergoing HCT, HP infection is associated with an independent and statistically significant protective effect against the development of acute gastrointestinal GVHD (OR=0.19 (95% CI: 0.05-0.67)). However, the previous correlation with the histological severity was not confirmed in the present study. One explanation for that is that more patients in the HP positive group were transplanted from an unrelated donor which is associated with a higher risk of developing advance grades III-IV GVHD. HP appears as a protective factor of GVHD in the multivariate analysis which means that this protective factor overcome the type of donor. That could be also the reason of the

absence of association between HP infection and a better overall survival; this effect would be subrogated to the development of gastrointestinal GVHD. Another prospective study in 128 patients by Au et al<sup>39</sup>, reported a significant reduction in the risk of developing acute gastrointestinal GVHD (RR=0.36 (95% CI: 0.13-0.98) p=0.04) in patients with HP infection. Our data confirm the results of Au et al, however it is important to point out that Au's paper includes only patients with sibling donors receiving bone marrow hematopoietic cells; in our study 93% of patients received peripheral blood stem cells and 51.9% from an unrelated donor; for that reasons this scenario is associated with a higher risk of GVHD (18% of gut GVHD in the Au paper as compared with 51% in our series).

Considering the fact that prevalence of HP infection is decreasing in developed countries due to eradication treatments, regular and widespread use of broad-spectrum antibiotics during HCT and that intestinal flora is reduced and changed after chemotherapy<sup>40</sup> we could observe a slowly progressive increase in the incidence of gastrointestinal GVHD in the future as it has already been observed in some studies<sup>41</sup>. Before eradicating HP in asymptomatic patients who are going to proceed to allogeneic transplant, potential protective effect on GVHD should be taken into account. To the best of our knowledge, this is the first prospective study suggesting HP infection protection against acute gastrointestinal GVHD in non-Asian countries in patients receiving peripheral blood HCT from related and unrelated donors. These and other new developments in microbiota will help in the future to decrease intestinal GVHD improving transplant outcome.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank Professor George B. McDonald M.D for reading and reviewing the paper as well as for his suggestions to improve the final version of the paper.

The authors thank the doctors and nurses of the Gastroenterology and Hematology Clinical Units as well as the Pathology Department for their collaboration/ help.

## **AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS**

Contribution: AVG wrote the manuscript and performed statistical analysis; AMS compiled the clinical data; LLC, LVL and DCB enrolled patients; OLG and ELP reviewed the clinical data; AVG, AMS and ARP performed the endoscopies; OBM performed histological analysis; ARP and DCB reviewed the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

## **DISCLOSURE OF CONFLICTS OF INTEREST**

The authors declare no competing financial interests.

## REFERENCES

- (1) Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:139-170.
- (2) Holmberg L, Kikuchi K, Gooley TA et al. Gastrointestinal graft-versus-host disease in recipients of autologous hematopoietic stem cells: incidence, risk factors, and outcome. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12:226-234.
- (3) Leisenring WM, Martin PJ, Petersdorf EW et al. An acute graft-versus-host disease activity index to predict survival after hematopoietic cell transplantation with myeloablative conditioning regimens. *Blood.* 2006;108:749-755.
- (4) Kuipers EJ, Pena AS, van Kamp G et al. Seroconversion for *Helicobacter pylori*. *Lancet.* 1993;342:328-331.
- (5) Malaty HM, El Kasabany A, Graham DY et al. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *Lancet.* 2002;359:931-935.
- (6) Go MF. Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16 Suppl 1:3-15.
- (7) Testerman TL, Morris J. Beyond the stomach: an updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J Gastroenterol.* 2014;20:12781-12808.
- (8) Zhou X, Wu J, Zhang G. Association between *Helicobacter pylori* and asthma: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2013;25:460-468.
- (9) Taye B, Enquselassie F, Tsegaye A et al. Is *Helicobacter Pylori* infection inversely associated with atopy? A systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Allergy.* 2014.
- (10) Hasni SA. Role of *Helicobacter pylori* infection in autoimmune diseases. *Curr Opin Rheumatol.* 2012;24:429-434.
- (11) Jones NL, Shannon PT, Cutz E, Yeger H, Sherman PM. Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells early in the natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Pathol.* 1997;151:1695-1703.
- (12) Moss SF, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut.* 1996;38:498-501.
- (13) Gisbert JP, Pajares JM. Review article: 13C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection -- a critical review. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20:1001-1017.
- (14) Cutler AF, Havstad S, Ma CK et al. Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology.* 1995;109:136-141.

- (15) Velasco-Guardado A, Lopez-Corral L, Perez-Simon JA et al. Helicobacter pylori infection and graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17:765-769.
- (16) Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant.* 1995;15:825-828.
- (17) Glucksberg H, Storb R, Fefer A et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation.* 1974;18:295-304.
- (18) Cruz-Correa M, Poonawala A, Abraham SC et al. Endoscopic findings predict the histologic diagnosis in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Endoscopy.* 2002;34:808-813.
- (19) Washington K, Jagasia M. Pathology of graft-versus-host disease in the gastrointestinal tract. *Hum Pathol.* 2009;40:909-917.
- (20) van der Velden WJ, Netea MG, de Haan AF et al. Role of the mycobiome in human acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19:329-332.
- (21) Jenq R, Marcel RM. Identification of intestinal commensal bacteria protective against GVHD in mice and humans. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20:S22-23.
- (22) Gerbitz A, Schultz M, Wilke A et al. Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt. *Blood.* 2004;103:4365-4367.
- (23) Taur Y, Jenq RR, Perales MA et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2014;124:1174-1182.
- (24) Larussa T, Leone I, Suraci E et al. Enhanced Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Helicobacter pylori-Infected Human Gastric Mucosa Modulates Th1/Th2 Pathway and Interleukin 17 Production. *Helicobacter.* 2014.
- (25) Chen Y, Blaser MJ. Inverse associations of Helicobacter pylori with asthma and allergy. *Arch Intern Med.* 2007;167:821-827.
- (26) Teshima T, Ordemann R, Reddy P et al. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med.* 2002;8:575-581.
- (27) Xun CQ, Thompson JS, Jennings CD, Brown SA, Widmer MB. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood.* 1994;83:2360-2367.
- (28) Nestel FP, Price KS, Seemayer TA, Lapp WS. Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease. *J Exp Med.* 1992;175:405-413.
- (29) Koyama M, Kuns RD, Olver SD et al. Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat Med.* 2012;18:135-142.

- (30) Tawara I, Koyama M, Liu C et al. Interleukin-6 modulates graft-versus-host responses after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Cancer Res.* 2011;17:77-88.
- (31) Hill GR, Teshima T, Rebel VI et al. The p55 TNF-alpha receptor plays a critical role in T cell alloreactivity. *J Immunol.* 2000;164:656-663.
- (32) Chakraverty R, Cote D, Buchli J et al. An inflammatory checkpoint regulates recruitment of graft-versus-host reactive T cells to peripheral tissues. *J Exp Med.* 2006;203:2021-2031.
- (33) Markey KA, MacDonald KP, Hill GR. The biology of graft-versus-host disease: experimental systems instructing clinical practice. *Blood.* 2014;124:354-362.
- (34) Wang Q, Yu C, Sun Y. The association between asthma and *Helicobacter pylori*: a meta-analysis. *Helicobacter.* 2013;18:41-53.
- (35) Del Prete G, Chiumiento L, Amedei A et al. Immunosuppression of TH2 responses in *Trichinella spiralis* infection by *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122:908-913.
- (36) Codolo G, Mazzi P, Amedei A et al. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* down-modulates Th2 inflammation in ovalbumin-induced allergic asthma. *Cell Microbiol.* 2008;10:2355-2363.
- (37) Luther J, Dave M, Higgins PD, Kao JY. Association between *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease: a meta-analysis and systematic review of the literature. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16:1077-1084.
- (38) Correia-Silva JF, Neto Victoria JM, Guimaraes AL et al. *Helicobacter pylori* in the oral mucosa of patients submitted to allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Braz Oral Res.* 2006;20:191-195.
- (39) Au WY, Wong RW, Wong BC et al. Reduced incidence of acute graft versus host disease (GVHD) of the gut in Chinese carriers of *Helicobacter pylori* during allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Hematol.* 2004;83:34-37.
- (40) Fuji S, Kapp M, Einsele H. Possible implication of bacterial infection in acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Oncol.* 2014;4:89.
- (41) Martin PJ, McDonald GB, Sanders JE et al. Increasingly frequent diagnosis of acute gastrointestinal graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004;10:320-327.





## 4.2 OTROS RESULTADOS

### 4.2.1 EVALUACIÓN MEDIANTE IMAGEN DE BANDA ESTRECHA (NBI) DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.

En nuestro estudio, se han realizado endoscopias digestivas altas utilizando la técnica de NBI a 50 pacientes con síntomas sugestivos de EICH gastrointestinal con endoscopio Olympus® modelo 190 con procesador EXERA III sin observarse un patrón vascular significativo característico de la EICH. Esto quizás sea debido a que las lesiones estudiadas con NBI (lesiones neoplásicas o premalignas, la infección por HP o la gastritis crónica o atrófica) son patologías crónicas (Figura 13) que ocasionan una modificación de la arquitectura vascular de la pared gástrica y por ello, reconocibles mediante esta técnica. Las lesiones propias de la EICH gastrointestinal se caracterizan por una inflamación aguda microscópica que probablemente no altere dicho patrón vascular y probablemente solo sean valorables dichos cambios en pacientes que desarrollen una EICH gastrointestinal crónica.

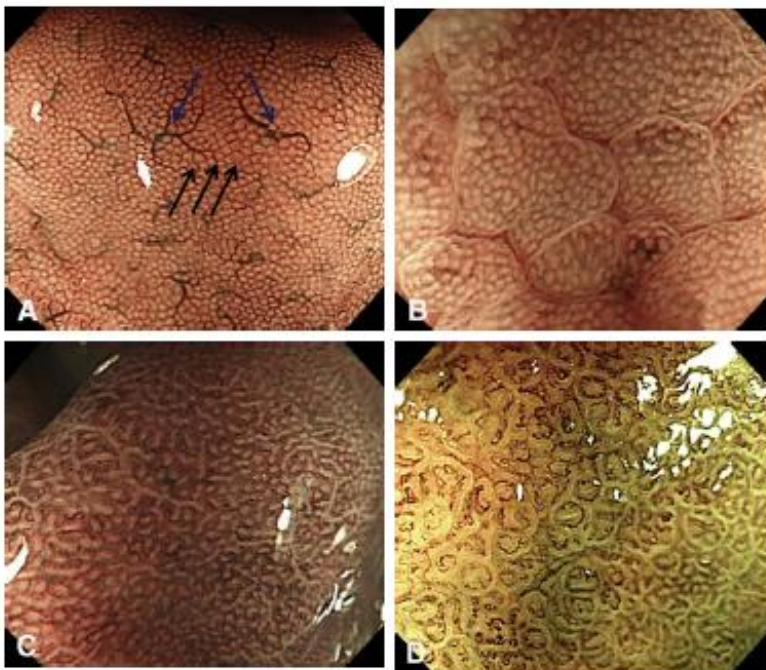


Figura 13: Distintos patrones de mucosa gástrica a nivel de cuerpo bajo visión con NBI y magnificación. A: patrón normal. B, C y D: patrones alterados patológicos. (65)

#### **4.2.2 EVALUACIÓN MEDIANTE ULTRASONOGRAFÍA ENDOSCÓPICA DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO**

Se ha realizado USE a 27 pacientes con medición del grosor de la pared a nivel de cuerpo y antro gástrico y a nivel de duodeno. En cada una de las localizaciones descritas se ha procedido a medir el grosor de las capas mucosa, submucosa y muscular. El grosor de la pared gástrica es ligeramente mayor en los pacientes con EICH moderada o grave con respecto a los pacientes con EICH leve o no EICH aunque estas diferencias no son significativas.

#### **4.2.3 COMPLICACIONES DE LOS PROCEDIMIENTOS ENDOSCÓPICOS DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO**

Los pacientes con endoscopias realizadas por nuestro grupo y que han sido recogidas para la realización de este proyecto de investigación, han presentado una tasa de complicaciones muy baja. La incidencia de hemorragia digestiva tras la realización de biopsia fue del 1% (4 de 391 procedimientos de biopsia). La hemorragia fue leve en tres casos y moderada en un caso que requirió técnicas endoscópicas para su control. En ninguna de las USEs realizadas se documentó ninguna complicación.

*DISCUSIÓN*





## 5. DISCUSIÓN

La endoscopia digestiva juega un papel muy importante en el diagnóstico de la EICH gastrointestinal. Sin embargo los resultados obtenidos en los diferentes estudios publicados en cuanto al rendimiento de dicha técnica son contradictorios (47; 49; 50). Los hallazgos endoscópicos son por lo general poco específicos y dependen del área biopsiada (47). Además la correlación con el grado clínico e histológico varía de unos estudios a otros (42; 47; 50). Cheung y colaboradores, en el año 2008, publicaron un estudio retrospectivo de 101 pacientes en el cual comparaban los hallazgos endoscópicos con los histológicos. Los hallazgos endoscópicos revelaron una asociación estadística significativa con las anomalías histológicas (OR=33,6 IC 95%: 4,3-261,1) y la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) fueron del 98%, 44%, 57% y 95% respectivamente. El coeficiente kappa de concordancia entre la graduación endoscópica e histológica fue del 0,423 ( $p < 0,001$ ) (42). En nuestro estudio (130), la sensibilidad de los hallazgos endoscópicos para el diagnóstico de EICH fue del 34%, la especificidad del 65%, el valor predictivo positivo (VPP) del 73% y el valor predictivo negativo (VPN) del 48% resultados inferiores a los reportados para esta localización. Por otro lado, 30 pacientes (35,3%) presentaban signos endoscópicos de EICH a pesar de que posteriormente no se confirmó el diagnóstico de EICH ni histológica ni clínicamente. Los hallazgos endoscópicos no se relacionaron con la gravedad clínica ni histológica.

Sin embargo, con el estudio histológico se obtuvo una sensibilidad, especificidad, VPP y VPN para las biopsias gástricas del 89%, 30,6%, 63,8% y 67% respectivamente, valores que se asemejan a los publicados por Ross y colaboradores (40). Además observamos una correlación entre la graduación histológica y el grado clínico de la

EICH gastrointestinal ( $p = 0,018$ ) con una  $r$  de Pearson de 0,24 ( $p = 0,006$ ) similar a la encontrada por Melson y cols (50) y al contrario de lo que postula Thompson y cols (47).

Nuestros resultados muestran que el diagnóstico basado en los hallazgos endoscópicos es pobre, con un elevado porcentaje de falsos positivos y negativos, y que estos hallazgos endoscópicos no se correlacionan con la gravedad clínica. Sin embargo, los cambios histológicos compatibles con EICH de las biopsias gástricas son semejantes a los de otros grupos y se correlacionan con la clínica. Nuestros datos sugieren que debe realizarse una recto-sigmoidoscopia para obtener un mayor rendimiento diagnóstico de la gastroscopia sólo en determinados casos y que debe tenerse en cuenta el riesgo de sangrado post-biopsias, y que la doble exploración supone una sobrecarga para los Servicios de Endoscopias.

Posterior a la publicación realizada por nuestro grupo, se han publicado cuatro estudios relacionados con la endoscopia en la EICH. El primer estudio, publicado por Martínez et al (131), observa que las endoscopias seriadas en los pacientes con clínica compatible con EICH gastrointestinal consigue un cambio en la actitud terapéutica en el 77% de los pacientes con respecto a los hallazgos del primer procedimiento. El estudio de Kreisel et al (46), retrospectivo, evaluó las colonoscopias realizadas por sospecha de EICH en 175 pacientes. Definieron unos nuevos criterios endoscópicos (Criterios de Freiburg) para el análisis de las colonoscopias en estos pacientes y obtuvieron una sensibilidad, especificidad, VPP y VPN del 89,2%, 79,4%, 79,6% y 89% respectivamente para el diagnóstico de la EICH gastrointestinal, obteniendo valores aún más altos en los casos en los que se había explorado el ileon terminal. Los buenos resultados obtenidos en el estudio de Kreisel con respecto a la capacidad diagnóstica de los criterios endoscópicos macroscópicos probablemente se deba a que excluyeron del análisis los casos de EICH

grado I que representan un alto porcentaje de endoscopias en las que no se observan alteraciones macroscópicas y consideran que en este grupo no se debe realizar un cambio terapéutico. Durante 2014 han aparecido dos estudios, el primero de Nomura et al (132), que analiza retrospectivamente los hallazgos endoscópicos e histológicos de las gastroscopias realizadas a 115 pacientes con sospecha de EICH gastrointestinal. Según Nomura los hallazgos endoscópicos (eritema, erosiones, exfoliación mucosa...) son útiles para el diagnóstico de la EICH gastrointestinal y el estudio histológico se debe realizar incluso cuando la mucosa es normal, observación realizada también en nuestro artículo (130). El otro estudio publicado en 2014, evaluó retrospectivamente 201 estudios endoscópicos altos en pacientes que recibieron un TACH. Obtuvieron una pobre concordancia entre la histología y el grado clínico, inferior a la observada en nuestro grupo, así como entre la histología y el grado endoscópico y una concordancia significativa entre el grado endoscópico y el grado clínico (133).

En cuanto a la relación entre EICH y HP se han publicado, hasta el inicio de este proyecto de investigación, dos estudios: un estudio brasileño prospectivo publicado en 2006 que no encontró relación entre la infección por HP (determinada mediante PCR en saliva) y el desarrollo de EICH en 46 pacientes sometidos a trasplante alogénico (123); y un estudio chino prospectivo publicado en 2003 (124). Au y colaboradores estudió la relación entre la infección por HP previa al trasplante y el desarrollo posterior de mucositis (toxicidad medicamentosa) o EICH aguda en 128 pacientes. Realizaron serologías mediante ELISA (*enzyme linked immunosorbant assay*) antes de la realización del trasplante. No obtuvieron un aumento del riesgo de mucositis en los pacientes portadores de HP, pero si obtuvieron en estos pacientes una disminución significativa del riesgo de desarrollo de EICH gastrointestinal agudo ( $p=0,04$ ;  $RR=0,36$ ;

IC 95%: 0,13-0,98). Al realizar un análisis multivariante, la no infección por HP y la presencia de mucositis, permanecían como predictores independientes del desarrollo de EICH gastrointestinal. Hay que tener en cuenta que el estudio de Au y colobadores incluye solamente pacientes con donantes emparentados y que recibieron un trasplante de células hematopoyéticas de médula ósea por lo que el escenario donde se ha estudiado dicho efecto no corresponde con el actual en las unidades de trasplante.

Nuestro grupo ha publicado un estudio sobre la relación entre HP y la EICH (134) y ha realizado un estudio prospectivo (ESTUDIO PEEICH) cuyos resultados están pendientes de publicación. El estudio publicado retrospectivo recogió un total de 338 endoscopias digestivas altas (gastroscopias) realizadas a 198 pacientes que habían recibido un TACH y que desarrollaron síntomas clínicos sospechosos de EICH. Se observó un efecto modulador negativo en los pacientes con infección por HP para el desarrollo de EICH aguda (RR, 0.60; IC al 95%: 0,46-0,79;  $p < 0,001$ ) y EICH crónica (RR: 0,75; IC al 95%: 0,61-0,92;  $p < 0,016$ ). Además, la presencia de HP se correlacionó inversamente con la gravedad histológica de la EICH ( $p < 0,003$ ). El segundo trabajo se diseñó con la intención de evitar sesgos de selección que podrían haber modificado los resultados del anterior estudio. El diseño de este artículo fue prospectivo con una evaluación pre-trasplante de la infección por HP. En él se incluyeron pacientes mayores de edad candidatos a recibir un TACH independientemente de la indicación del mismo así como de las características del mismo. Se observó mediante análisis multivariante que los pacientes portadores de una infección por HP presentaban una menor incidencia de EICH de manera significativa (OR=0.19; IC al 95%: 0.05-0.67;  $p = 0.010$ ). Sin embargo, en este estudio no encontramos una correlación entre la infección por HP y la gravedad histológica probablemente debido a que se observó una incidencia mayor de



infección por HP en pacientes que recibieron trasplante de donante no emparentado que se asocia a una mayor proporción de EICH moderada-grave.

A pesar de que HP no es considerado parte de la flora habitual gastrointestinal dado su conocido potencial patógeno, sabemos que posee cierta capacidad inmunomoduladora. Estudios recientes de laboratorio atribuyen al HP cierta capacidad para modular la respuesta inmune, incrementando la expresión de marcadores celulares T-reguladores de la mucosa gástrica que pueden modificar la inmunidad y evitar una respuesta Th1/Th17 (98; 99). En la mucosa gástrica de pacientes infectados con HP, una mayor expresión de Indolamina 2,3 dioxigenasa es capaz de modular la respuesta Th1/Th2 y Th17. Este mecanismo reduce la inflamación gástrica contribuyendo a la cronicidad de la infección por HP (135). Chen y Blaser (136) sugieren que la intensidad de la respuesta del huésped ante cepas especialmente agresivas de HP (portadoras del gen Cag A) podrían alterar el patrón Th1/Th2 con la inducción de linfocitos inmunoreguladores que podrían prevenir respuestas inmunes de hiperreactividad como las que se dan en el asma o la atopía donde el patrón Th2 es el predominante.

Varios grupos han demostrado que la intensidad de la radiación total y la quimioterapia utilizada en el acondicionamiento del TACH altera la integridad de la mucosa gastrointestinal y favorecería la transferencia de moléculas de origen bacteriano de la flora intestinal a la circulación sistémica. Estas moléculas activarían al TNF e IL 1 y 6 (16; 18; 19), así como a las células presentadoras de antígenos (137) de manera que se estimularían las células T del donante (20; 138) y la formación de un proceso inflamatorio que permitiría el acceso de las células T al tejido diana en la EICH (139). El impacto de la infección por HP en la disminución de la EICH aguda gastrointestinal podría ser debido a su capacidad en la producción de linfocitos T reguladores en el

tejido gastrointestinal (98; 99; 136), ya que es bien sabido que el aumento de linfocitos T reguladores se asocia con una menor incidencia de EICH (21).

Si consideramos que la prevalencia de la infección por HP está disminuyendo en los países desarrollados debido a la utilización de tratamiento erradicadores de la enfermedad, el uso generalizado y regular de antibióticos de amplio espectro en el post-trasplante y que la flora intestinal se reduce y cambia tras los tratamientos de quimioterapia (92), podríamos observar un incremento lentamente progresivo en la incidencia de la EICH gastrointestinal en un futuro, como ya se ha observado en varios estudios (53).

Otro aspecto importante a destacar como conclusión de estos estudios sería la actitud a seguir en el caso de que se diagnostique una infección por HP en una paciente con sospecha clínica de EICH gastrointestinal. Nuestra recomendación sería no erradicar el HP a no ser que presentara indicaciones para su tratamiento según las guías de consenso publicadas al respecto (129; 140).

*CONCLUSIONES*





## 6. CONCLUSIONES

### PRIMERA

La rentabilidad diagnóstica de la endoscopia digestiva alta para el diagnóstico precoz de la Enfermedad Injerto contra Huésped es baja. La tasa de complicaciones de los procedimientos endoscópicos diagnósticos es también baja.

### SEGUNDA

La utilización de nuevas técnicas endoscópicas como el sistema NBI y la ultrasonografía endoscópica no parecen ser útiles para el diagnóstico precoz de la Enfermedad Injerto contra Huésped cuando afecta al tracto gastrointestinal.

### TERCERA

Los resultados de las biopsias gástricas muestran una alta rentabilidad con una sensibilidad del 89% y un VPN del 67%. El grado histológico de las biopsias obtenidas con dicho procedimiento se relaciona con el grado clínico de la enfermedad.

### CUARTA

En el estudio retrospectivo la infección por *Helicobacter pylori* ejerce un papel inmunomodulador protector contra el desarrollo de la Enfermedad Injerto contra Huésped gastrointestinal tras el Trasplante Alogénico de Células Hematopoyéticas. La infección por *Helicobacter pylori* se correlacionó inversamente con la incidencia y con la gravedad histológica de la misma.

### QUINTA

En el estudio prospectivo de nuevo se observa un efecto protector de la infección por *Helicobacter pylori* contra el desarrollo de la Enfermedad Injerto contra Huésped aunque en esta ocasión no se correlacionó con la gravedad histológica.

## **SEXTA**

Estos datos indicarían la no conveniencia de tratar la infección por *Helicobacter pylori* en pacientes que van a ser sometidos a TACH, salvo patología grave concomitante por esta infección.

**BIBLIOGRAFÍA**







## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 1974;18:295-304.
2. Washington K, Jagasia M. Pathology of graft-versus-host disease in the gastrointestinal tract. *Hum Pathol* 2009;40:909-917.
3. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol* 2007;25:139-170.
4. McDonald GB., Sale GE. The human gastrointestinal tract after allogeneic marrow transplantation. In: Sale GI and Shulman HM, eds. *The Pathology of Bone Marrow Transplantation*. New York: Masson, 1984:83.
5. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* 2001;411:385-389.
6. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009;373:1550-1561.
7. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* 1966;62:21-78.
8. Kernan NA, Collins NH, Juliano L, Cartagena T, Dupont B, O'Reilly RJ. Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. *Blood* 1986;68:770-773.
9. Krensky AM, Weiss A, Crabtree G, Davis MM, Parham P. T-lymphocyte-antigen interactions in transplant rejection. *N Engl J Med* 1990;322:510-517.
10. Loiseau P, Busson M, Balere ML, Dormoy A, Bignon JD, Gagne K, Gebuhrer L, Dubois V, Jollet I, Bois M, Perrier P, Masson D, Moine A, Absi L, Reviron D, Lepage V, Tamouza R, Toubert A, Marry E, Chir Z, Jouet JP, Blaise D, Charron D, Raffoux C. HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:965-974.
11. Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorka D, Devine SM, Klein JL, Weisdorf D, Fay JW, Nademanee A, Antin JH, Christiansen NP, van der JR, Herzig RH, Litzow MR, Wolff SN, Longo WL, Petersen FB, Karanes C, Avalos B, Storb R, Buell DN, Maher RM, Fitzsimmons WE, Wingard JR. Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood* 1998;92:2303-2314.
12. Barker JN, Wagner JE. Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:526-532.

13. Cornetta K, Laughlin M, Carter S, Wall D, Weinthal J, Delaney C, Wagner J, Sweetman R, McCarthy P, Chao N. Umbilical cord blood transplantation in adults: results of the prospective Cord Blood Transplantation (COBLT). *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:149-160.
14. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, Goldman A, Kersey J, Krivit W, MacMillan ML, Orchard PJ, Peters C, Weisdorf DJ, Ramsay NK, Davies SM. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002;100:1611-1618.
15. Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1991;324:667-674.
16. Nestel FP, Price KS, Seemayer TA, Lapp WS. Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease. *J Exp Med* 1992;175:405-413.
17. Cooke KR, Gerbitz A, Crawford JM, Teshima T, Hill GR, Tesolin A, Rossignol DP, Ferrara JL. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 2001;107:1581-1589.
18. Teshima T, Ordemann R, Reddy P, Gagrin S, Liu C, Cooke KR, Ferrara JL. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med* 2002;8:575-581.
19. Xun CQ, Thompson JS, Jennings CD, Brown SA, Widmer MB. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood* 1994;83:2360-2367.
20. Hill GR, Teshima T, Rebel VI, Krijanovski OI, Cooke KR, Brinson YS, Ferrara JL. The p55 TNF-alpha receptor plays a critical role in T cell alloreactivity. *J Immunol* 2000;164:656-663.
21. Markey KA, MacDonald KP, Hill GR. The biology of graft-versus-host disease: experimental systems instructing clinical practice. *Blood* 2014;124:354-362.
22. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, Shlomchik MJ, Emerson SG. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 1999;285:412-415.
23. Toubai T, Tawara I, Sun Y, Liu C, Nieves E, Evers R, Friedman T, Korngold R, Reddy P. Induction of acute GVHD by sex-mismatched H-Y antigens in the absence of functional radiosensitive host hematopoietic-derived antigen-presenting cells. *Blood* 2012;119:3844-3853.
24. Matte CC, Liu J, Cormier J, Anderson BE, Athanasiadis I, Jain D, McNiff J, Shlomchik WD. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med* 2004;10:987-992.
25. Li H, Demetris AJ, McNiff J, Matte-Martone C, Tan HS, Rothstein DM, Lakkis FG, Shlomchik WD. Profound depletion of host conventional dendritic cells, plasmacytoid

- dendritic cells, and B cells does not prevent graft-versus-host disease induction. *J Immunol* 2012;188:3804-3811.
26. Reshef R, Luger SM, Hexner EO, Loren AW, Frey NV, Nasta SD, Goldstein SC, Stadtmauer EA, Smith J, Bailey S, Mick R, Heitjan DF, Emerson SG, Hoxie JA, Vonderheide RH, Porter DL. Blockade of lymphocyte chemotaxis in visceral graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2012;367:135-145.
  27. Martin PJ, Schoch G, Fisher L, Byers V, Anasetti C, Appelbaum FR, Beatty PG, Doney K, McDonald GB, Sanders JE, . A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood* 1990;76:1464-1472.
  28. Sullivan KM, Agura E, Anasetti C, Appelbaum F, Badger C, Bearman S, Erickson K, Flowers M, Hansen J, Loughran T, . Chronic graft-versus-host disease and other late complications of bone marrow transplantation. *Semin Hematol* 1991;28:250-259.
  29. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, Martin P, Chien J, Przepiorka D, Couriel D, Cowen EW, Dinndorf P, Farrell A, Hartzman R, Henslee-Downey J, Jacobsohn D, McDonald G, Mittleman B, Rizzo JD, Robinson M, Schubert M, Schultz K, Shulman H, Turner M, Vogelsang G, Flowers ME. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:945-956.
  30. Cahn JY, Klein JP, Lee SJ, Milpied N, Blaise D, Antin JH, Leblond V, Ifrah N, Jouet JP, Loberiza F, Ringden O, Barrett AJ, Horowitz MM, Socie G. Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Societe Francaise de Greffe de Moelle et Therapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood* 2005;106:1495-1500.
  31. Anasetti C, Rybka W, Sullivan KM, Banaji M, Slichter SJ. Graft-v-host disease is associated with autoimmune-like thrombocytopenia. *Blood* 1989;73:1054-1058.
  32. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, Hurley C, Kollman C, Anasetti C, Noreen H, Begovich A, Hildebrand W, Petersdorf E, Schmeckpeper B, Setterholm M, Trachtenberg E, Williams T, Yunis E, Weisdorf D. Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood* 2004;104:1923-1930.
  33. Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, Martin PJ, Mickelson EM, Smith AG, Hansen JA. The significance of HLA-DRB1 matching on clinical outcome after HLA-A, B, DR identical unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 1995;86:1606-1613.
  34. Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med* 2003;54:29-52.
  35. Lee SJ, Klein JP, Barrett AJ, Ringden O, Antin JH, Cahn JY, Carabasi MH, Gale RP, Giralt S, Hale GA, Ilhan O, McCarthy PL, Socie G, Verdonck LF, Weisdorf DJ, Horowitz MM. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood* 2002;100:406-414.

36. Carlens S, Ringden O, Remberger M, Lonnqvist B, Hagglund H, Klaesson S, Mattsson J, Svahn BM, Winiarski J, Ljungman P, Aschan J. Risk factors for chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: a retrospective single centre analysis. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:755-761.
37. Michalek J, Collins RH, Hill BJ, Brenchley JM, Douek DC. Identification and monitoring of graft-versus-host specific T-cell clone in stem cell transplantation. *Lancet* 2003;361:1183-1185.
38. Paczesny S, Levine JE, Braun TM, Ferrara JL. Plasma biomarkers in graft-versus-host disease: a new era? *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:33-38.
39. Cox GJ, Matsui SM, Lo RS, Hinds M, Bowden RA, Hackman RC, Meyer WG, Mori M, Tarr PI, Oshiro LS, . Etiology and outcome of diarrhea after marrow transplantation: a prospective study. *Gastroenterology* 1994;107:1398-1407.
40. Ross WA, Ghosh S, Dekovich AA, Liu S, Ayers GD, Cleary KR, Lee JH, Couriel D. Endoscopic biopsy diagnosis of acute gastrointestinal graft-versus-host disease: rectosigmoid biopsies are more sensitive than upper gastrointestinal biopsies. *Am J Gastroenterol* 2008;103:982-989.
41. Cruz-Correa M, Poonawala A, Abraham SC, Wu TT, Zahurak M, Vogelsang G, Kalloo AN, Lee LA. Endoscopic findings predict the histologic diagnosis in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Endoscopy* 2002;34:808-813.
42. Cheung DY, Kim JI, Kim SS, Sung HY, Cho SH, Park SH, Han JY, Kim JK, Lee JW, Min WS, Park GS, Kang CS. Endoscopic evaluation in gastrointestinal graft-versus-host disease: comparisons with histological findings. *Dig Dis Sci* 2008;53:2947-2954.
43. Ponec RJ, Hackman RC, McDonald GB. Endoscopic and histologic diagnosis of intestinal graft-versus-host disease after marrow transplantation. *Gastrointest Endosc* 1999;49:612-621.
44. Roy J, Snover D, Weisdorf S, Mulvahill A, Filipovich A, Weisdorf D. Simultaneous upper and lower endoscopic biopsy in the diagnosis of intestinal graft-versus-host disease. *Transplantation* 1991;51:642-646.
45. Bombi JA, Nadal A, Carreras E, Ramirez J, Munoz J, Rozman C, Cardesa A. Assessment of histopathologic changes in the colonic biopsy in acute graft-versus-host disease. *Am J Clin Pathol* 1995;103:690-695.
46. Kreisel W, Dahlberg M, Bertz H, Harder J, Potthoff K, Deibert P, Schmitt-Graeff A, Finke J. Endoscopic diagnosis of acute intestinal GVHD following allogeneic hematopoietic SCT: a retrospective analysis in 175 patients. *Bone Marrow Transplant* 2012;47:430-438.
47. Thompson B, Salzman D, Steinhauer J, Lazenby AJ, Wilcox CM. Prospective endoscopic evaluation for gastrointestinal graft-versus-host disease: determination of the best diagnostic approach. *Bone Marrow Transplant* 2006;38:371-376.
48. Wakui M, Okamoto S, Ishida A, Kobayashi H, Watanabe R, Yajima T, Iwao Y, Hisamatsu T, Hibi T, Ikeda Y. Prospective evaluation for upper gastrointestinal tract acute graft-

- versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:573-578.
49. kreisel W, Herbst EW, Schwind B, Ochs A, Olschewski M, Kochling G, et al. Diagnosis and grading of acute graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation by sigmoidoscopy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994;6:723-730.
  50. Melson J, Jakate S, Fung H, Arai S, Keshavarzian A. Crypt loss is a marker of clinical severity of acute gastrointestinal graft-versus-host disease. *Am J Hematol* 2007;82:881-886.
  51. Tzung SP, Hackman RC, Hockenbery DM, Bensinger W, Schiffman K, McDonald GB. Lymphocytic gastritis resembling graft-vs.-host disease following autologous hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 1998;4:43-48.
  52. Harada K, Higaki S, Hashimoto K, Hashimoto S, Oga A, Gondo T, Sakaida I. Study on the colonoscopic features of GVHD enteritis that developed after hematopoietic stem cell transplantation. *Hepatogastroenterology* 2007;54:2221-2227.
  53. Martin PJ, McDonald GB, Sanders JE, Anasetti C, Appelbaum FR, Deeg HJ, Nash RA, Petersdorf EW, Hansen JA, Storb R. Increasingly frequent diagnosis of acute gastrointestinal graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004;10:320-327.
  54. Bojarski C, Gunther U, Rieger K, Heller F, Loddenkemper C, Grunbaum M, Uharek L, Zeitz M, Hoffmann JC. In vivo diagnosis of acute intestinal graft-versus-host disease by confocal endomicroscopy. *Endoscopy* 2009;41:433-438.
  55. Yakoub-Agha I, Maunoury V, Wacrenier A, Couignoux S, Depil S, Desreumaux P, Bauters F, Colombel JF, Jouet JP. Impact of Small Bowel Exploration Using Video-Capsule Endoscopy in the Management of Acute Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease. *Transplantation* 2004;78:1697-1701.
  56. Neumann S, Schoppmeyer K, Lange T, Wiedmann M, Golsong J, Tannapfel A, Mossner J, Niederwieser D, Caca K. Wireless capsule endoscopy for diagnosis of acute intestinal graft-versus-host disease. *Gastrointest Endosc* 2007;65:403-409.
  57. Varadarajan P, Dunford LM, Thomas JA, Brown K, Paplham P, Syta M, Schiff M, Padmanabhan S, Battiwalla M, Smiley S, Hahn T, McCarthy PL, Jr. Seeing what's out of sight: wireless capsule endoscopy's unique ability to visualize and accurately assess the severity of gastrointestinal graft-versus-host-disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:643-648.
  58. Coron E, Laurent V, Malard F, Le Rhun M, Chevallier P, Guillaume T, Mosnier JF, Galmiche JP, Mohty M. Early detection of acute graft-versus-host disease by wireless capsule endoscopy and probe-based confocal laser endomicroscopy: results of a pilot study. *United European Gastroenterol J* 2014;2:206-215.
  59. Onozawa M, Yonezumi M, Kawarazaki M, Izumiyama K, Chiba K, Kondo T, Ota S, Kobayashi S, Kato M, Hashino S, Tanaka J, Imamura M, Asaka M. Usefulness of magnifying endoscopic evaluation of the terminal ileum for a patient with graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2005;84:106-109.

60. Kuznetsov K, Lambert R, Rey JF. Narrow-band imaging: potential and limitations. *Endoscopy* 2006;38:76-81.
61. Goda K, Tajiri H, Ikegami M, Urashima M, Nakayoshi T, Kaise M. Usefulness of magnifying endoscopy with narrow band imaging for the detection of specialized intestinal metaplasia in columnar-lined esophagus and Barrett's adenocarcinoma. *Gastrointest Endosc* 2007;65:36-46.
62. Shibuya K, Hoshino H, Chiyo M, Iyoda A, Yoshida S, Sekine Y, Iizasa T, Saitoh Y, Baba M, Hiroshima K, Ohwada H, Fujisawa T. High magnification bronchovideoscopy combined with narrow band imaging could detect capillary loops of angiogenic squamous dysplasia in heavy smokers at high risk for lung cancer. *Thorax* 2003;58:989-995.
63. Machida H, Sano Y, Hamamoto Y, Muto M, Kozu T, Tajiri H, Yoshida S. Narrow-band imaging in the diagnosis of colorectal mucosal lesions: a pilot study. *Endoscopy* 2004;36:1094-1098.
64. Bansal A, Ulusarac O, Mathur S, Sharma P. Correlation between narrow band imaging and nonneoplastic gastric pathology: a pilot feasibility trial. *Gastrointest Endosc* 2008;67:210-216.
65. Tahara T, Shibata T, Nakamura M, Yoshioka D, Okubo M, Arisawa T, Hirata I. Gastric mucosal pattern by using magnifying narrow-band imaging endoscopy clearly distinguishes histological and serological severity of chronic gastritis. *Gastrointest Endosc* 2009;70:246-253.
66. Kanzaki H, Uedo N, Ishihara R, Nagai K, Matsui F, Ohta T, Hanafusa M, Hanaoka N, Takeuchi Y, Higashino K, Iishi H, Tomita Y, Tatsuta M, Yamamoto K. Comprehensive investigation of areae gastricae pattern in gastric corpus using magnifying narrow band imaging endoscopy in patients with chronic atrophic fundic gastritis. *Helicobacter* 2012;17:224-231.
67. Varas Lorenzo MJ. Pliegues gástricos engrosados y estadificación por ecoendoscopia del linfoma gástrico tipo MALT de bajo grado. *Ultrasonografía endoscópica. Aplicaciones diagnósticas y terapéuticas*. Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A., 2008:47-56.
68. Avunduk C, Navab F, Hampf F, Coughlin B. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with large gastric folds: evaluation and follow-up with endoscopic ultrasound before and after antimicrobial therapy. *Am J Gastroenterol* 1995;90:1969-1973.
69. Gines A, Pellise M, Fernandez-Esparrach G, Soria MT, Mata A, Membrillo A, Martinez-Palli G, Sole MM, Llach J, Bordas JM, Pique JM. Endoscopic ultrasonography in patients with large gastric folds at endoscopy and biopsies negative for malignancy: predictors of malignant disease and clinical impact. *Am J Gastroenterol* 2006;101:64-69.
70. Songur Y, Okai T, Watanabe H, Motoo Y, Sawabu N. Endosonographic evaluation of giant gastric folds. *Gastrointest Endosc* 1995;41:468-474.
71. Snady H. Endoscopic ultrasonography: an effective new tool for diagnosing gastrointestinal tumors. *Oncology (Williston Park)* 1992;6:63-74.

72. Fallows G, Rubinger M, Bernstein CN. Does gastroenterology consultation change management of patients receiving hematopoietic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant* 2001;28:289-294.
73. Iqbal N, Salzman D, Lazenby AJ, Wilcox CM. Diagnosis of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3034-3038.
74. Schwartz JM, Wolford JL, Thornquist MD, Hockenbery DM, Murakami CS, Drennan F, Hinds M, Strasser SI, Lopez-Cubero SO, Brar HS, Ko CW, Saunders MD, Okolo CN, McDonald GB. Severe gastrointestinal bleeding after hematopoietic cell transplantation, 1987-1997: incidence, causes, and outcome. *Am J Gastroenterol* 2001;96:385-393.
75. Kaur S, Cooper G, Fakult S, Lazarus HM. Incidence and outcome of overt gastrointestinal bleeding in patients undergoing bone marrow transplantation. *Dig Dis Sci* 1996;41:598-603.
76. Khan K, Schwarzenberg SJ, Sharp H, Jessurun J, Gulbahce HE, Defor T, Nagarajan R. Diagnostic endoscopy in children after hematopoietic stem cell transplantation. *Gastrointest Endosc* 2006;64:379-385.
77. Bianco JA, Pepe MS, Higano C, Applebaum FR, McDonald GB, Singer JW. Prevalence of clinically relevant bacteremia after upper gastrointestinal endoscopy in bone marrow transplant recipients. *Am J Med* 1990;89:134-136.
78. Ross WA, Couriel D. Colonic graft-versus-host disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:64-69.
79. Kalantari BN, Morteale KJ, Cantisani V, Ondategui S, Glickman JN, Gogate A, Ros PR, Silverman SG. CT features with pathologic correlation of acute gastrointestinal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation in adults. *AJR Am J Roentgenol* 2003;181:1621-1625.
80. Schulenburg A, Turetschek K, Wrba F, Vogelsang H, Greinix HT, Keil F, Mitterbauer M, Kalhs P. Early and late gastrointestinal complications after myeloablative and nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2004;83:101-106.
81. Klein SA, Martin H, Schreiber-Dietrich D, Hermann S, Caspary WF, Hoelzer D, Dietrich CF. A new approach to evaluating intestinal acute graft-versus-host disease by transabdominal sonography and colour Doppler imaging. *Br J Haematol* 2001;115:929-934.
82. Salomao R, Brunialti MK, Rapozo MM, Baggio-Zappia GL, Galanos C, Freudenberg M. Bacterial sensing, cell signaling, and modulation of the immune response during sepsis. *Shock* 2012;38:227-242.
83. Lichtenstern C, Brenner T, Bardenheuer HJ, Weigand MA. Predictors of survival in sepsis: what is the best inflammatory marker to measure? *Curr Opin Infect Dis* 2012;25:328-336.
84. van der Velden WJ, Netea MG, de Haan AF, Huls GA, Donnelly JP, Blijlevens NM. Role of the mycobiome in human acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19:329-332.

85. Beelen DW, Haralambie E, Brandt H, Linzenmeier G, Muller KD, Quabeck K, Sayer HG, Graeven U, Mahmoud HK, Schaefer UW. Evidence that sustained growth suppression of intestinal anaerobic bacteria reduces the risk of acute graft-versus-host disease after sibling marrow transplantation. *Blood* 1992;80:2668-2676.
86. Beelen DW, Elmaagacli A, Muller KD, Hirche H, Schaefer UW. Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial. *Blood* 1999;93:3267-3275.
87. Alonso CD, Treadway SB, Hanna DB, Huff CA, Neofytos D, Carroll KC, Marr KA. Epidemiology and outcomes of *Clostridium difficile* infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2012;54:1053-1063.
88. Chakrabarti S, Lees A, Jones SG, Milligan DW. *Clostridium difficile* infection in allogeneic stem cell transplant recipients is associated with severe graft-versus-host disease and non-relapse mortality. *Bone Marrow Transplant* 2000;26:871-876.
89. Jenq R, Marcel RM. Identification of intestinal commensal bacteria protective against GVHD in mice and humans. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20:S22-23.
90. Gerbitz A, Schultz M, Wilke A, Linde HJ, Scholmerich J, Andreesen R, Holler E. Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt. *Blood* 2004;103:4365-4367.
91. Taur Y, Jenq RR, Perales MA, Littmann ER, Morjaria S, Ling L, No D, Gobourne A, Viale A, Dahi PB, Ponce DM, Barker JN, Giralt S, van den BM, Pamer EG. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2014;124:1174-1182.
92. Fuji S, Kapp M, Einsele H. Possible implication of bacterial infection in acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Oncol* 2014;4:89.
93. Testerman TL, Morris J. Beyond the stomach: an updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J Gastroenterol* 2014;20:12781-12808.
94. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, Blaser MJ, Graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, Yamaoka Y, Megraud F, Otto K, Reichard U, Katzowitsch E, Wang X, Achtman M, Suerbaum S. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 2003;299:1582-1585.
95. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, van der Merwe SW, Yamaoka Y, Graham DY, Perez-Trallero E, Wadstrom T, Suerbaum S, Achtman M. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 2007;445:915-918.
96. Kuipers EJ, Pena AS, van Kamp G, Uytendaele AM, Pals G, Pels NF, Kurz-Pohlmann E, Meuwissen SG. Seroconversion for *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1993;342:328-331.



97. Malaty HM, El Kasabany A, Graham DY, Miller CC, Reddy SG, Srinivasan SR, Yamaoka Y, Berenson GS. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *Lancet* 2002;359:931-935.
98. Moss SF, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 1996;38:498-501.
99. Jones NL, Shannon PT, Cutz E, Yeger H, Sherman PM. Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells early in the natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Pathol* 1997;151:1695-1703.
100. Cutler AF, Havstad S, Ma CK, Blaser MJ, Perez-Perez GI, Schubert TT. Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 1995;109:136-141.
101. Gisbert JP, Pajares JM. Review article: 13C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection -- a critical review. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:1001-1017.
102. Zhang S, Guo Y, Ma Y, Teng Y. Cytotoxin-associated gene-A-seropositive virulent strains of *Helicobacter pylori* and atherosclerotic diseases: a systematic review. *Chin Med J (Engl)* 2008;121:946-951.
103. Gong H, Shi Y, Zhou L, Tao L, Shi Y, Cao W, Cheng L. *Helicobacter pylori* infection of the larynx may be an emerging risk factor for laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Transl Oncol* 2012;14:905-910.
104. Zavos C, Kountouras J, Sakkias G, Venizelos I, Deretzi G, Arapoglou S. Histological presence of *Helicobacter pylori* bacteria in the trabeculum and iris of patients with primary open-angle glaucoma. *Ophthalmic Res* 2012;47:150-156.
105. Cvorovic L, Brajovic D, Strbac M, Milutinovic Z, Cvorovic V. Detection of *Helicobacter pylori* in nasal polyps: preliminary report. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;37:192-195.
106. Luther J, Dave M, Higgins PD, Kao JY. Association between *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease: a meta-analysis and systematic review of the literature. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1077-1084.
107. Xie FJ, Zhang YP, Zheng QQ, Jin HC, Wang FL, Chen M, Shao L, Zou DH, Yu XM, Mao WM. *Helicobacter pylori* infection and esophageal cancer risk: an updated meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2013;19:6098-6107.
108. Rokkas T, Pistiolas D, Sechopoulos P, Robotis I, Margantinis G. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and esophageal neoplasia: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:1413-7, 1417.
109. Smyk DS, Koutsoumpas AL, Mytilinaiou MG, Rigopoulou EI, Sakkas LI, Bogdanos DP. *Helicobacter pylori* and autoimmune disease: cause or bystander. *World J Gastroenterol* 2014;20:613-629.

110. Li W, Minohara M, Su JJ, Matsuoka T, Osoegawa M, Ishizu T, Kira J. Helicobacter pylori infection is a potential protective factor against conventional multiple sclerosis in the Japanese population. *J Neuroimmunol* 2007;184:227-231.
111. Nielsen HH, Qiu J, Friis S, Wermuth L, Ritz B. Treatment for Helicobacter pylori infection and risk of Parkinson's disease in Denmark. *Eur J Neurol* 2012;19:864-869.
112. Beydoun MA, Beydoun HA, Shroff MR, Kitner-Triolo MH, Zonderman AB. Helicobacter pylori seropositivity and cognitive performance among US adults: evidence from a large national survey. *Psychosom Med* 2013;75:486-496.
113. Huang X, Qu X, Yan W, Huang Y, Cai M, Hu B, Wu L, Lin H, Chen Z, Zhu C, Lu L, Sun X, Rong L, Jiang Y, Sun D, Zhong L, Xiong P. Iron deficiency anaemia can be improved after eradication of Helicobacter pylori. *Postgrad Med J* 2010;86:272-278.
114. Yuan W, Li Y, Yang K, Ma B, Guan Q, Wang D, Yang L. Iron deficiency anemia in Helicobacter pylori infection: meta-analysis of randomized controlled trials. *Scand J Gastroenterol* 2010;45:665-676.
115. Asahi A, Nishimoto T, Okazaki Y, Suzuki H, Masaoka T, Kawakami Y, Ikeda Y, Kuwana M. Helicobacter pylori eradication shifts monocyte Fcγ receptor balance toward inhibitory FcγRIIB in immune thrombocytopenic purpura patients. *J Clin Invest* 2008;118:2939-2949.
116. Konturek PC, Rienecker H, Hahn EG, Raithel M. Helicobacter pylori as a protective factor against food allergy. *Med Sci Monit* 2008;14:CR452-CR458.
117. Zhou X, Wu J, Zhang G. Association between Helicobacter pylori and asthma: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013;25:460-468.
118. Wang Q, Yu C, Sun Y. The association between asthma and Helicobacter pylori: a meta-analysis. *Helicobacter* 2013;18:41-53.
119. Imamura S, Sugimoto M, Kanemasa K, Sumida Y, Okanoue T, Yoshikawa T, Yamaoka Y. Inverse association between Helicobacter pylori infection and allergic rhinitis in young Japanese. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:1244-1249.
120. Taye B, Enquesselassie F, Tsegaye A, Medhin G, Davey G, Venn A. Is Helicobacter Pylori infection inversely associated with atopy? A systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Allergy* 2014.
121. Luther J, Dave M, Higgins PD, Kao JY. Association between Helicobacter pylori infection and inflammatory bowel disease: A meta-analysis and systematic review of the literature. *Inflamm Bowel Dis* 2009.
122. Luther J, Owyang SY, Takeuchi T, Cole TS, Zhang M, Liu M, Erb-Downward J, Rubenstein JH, Chen CC, Pierzchala AV, Paul JA, Kao JY. Helicobacter pylori DNA decreases pro-inflammatory cytokine production by dendritic cells and attenuates dextran sodium sulphate-induced colitis. *Gut* 2011;60:1479-1486.
123. Correia-Silva JF, Neto Victoria JM, Guimaraes AL, de Sa AR, Gomes CC, de Almeida HC, Gomez RS. Helicobacter pylori in the oral mucosa of patients submitted to allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Braz Oral Res* 2006;20:191-195.

124. Au WY, Wong RW, Wong BC, Lie AK, Liang R, Leung AY, Kwong YL. Reduced incidence of acute graft versus host disease (GVHD) of the gut in Chinese carriers of *Helicobacter pylori* during allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Hematol* 2004;83:34-37.
125. Sawalha AH, Schmid WR, Binder SR, Bacino DK, Harley JB. Association between systemic lupus erythematosus and *Helicobacter pylori* seronegativity. *J Rheumatol* 2004;31:1546-1550.
126. Chiu YC, Tai WC, Chuah SK, Hsu PI, Wu DC, Wu KL, Huang CC, Ho JC, Ring J, Chen WC. The Clinical Correlations of *Helicobacter pylori* Virulence Factors and Chronic Spontaneous Urticaria. *Gastroenterol Res Pract* 2013;2013:436727.
127. Bassi V, Marino G, Iengo A, Fattoruso O, Santinelli C. Autoimmune thyroid diseases and *Helicobacter pylori*: the correlation is present only in Graves's disease. *World J Gastroenterol* 2012;18:1093-1097.
128. Ghabaee M, Ghanbarian D, Brujeni GN, Bokaei S, Siavoshi F, Gharibzadeh S. Could *Helicobacter pylori* play an important role in axonal type of Guillain-Barre syndrome pathogenesis? *Clin Neurol Neurosurg* 2010;112:193-198.
129. Mones J, Gisbert JP, Borda F, Dominguez-Munoz E. Indications, diagnostic tests and *Helicobacter pylori* eradication therapy. Recommendations by the 2nd Spanish Consensus Conference. *Rev Esp Enferm Dig* 2005;97:348-374.
130. Velasco-Guardado A, Lopez-Corral L, Alvarez-Delgado A, Flores-Corral T, Geijo-Martinez F, Caballero-Barrigon D, Rodriguez-Perez A. Endoscopic evaluation and histological findings in graft-versus-host disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2012;104:310-314.
131. Martinez C, Rosales M, Calvo X, Cuatrecasas M, Rodriguez-Carunchio L, Llach J, Fernandez-Aviles F, Rosinol L, Rovira M, Carreras E, Urbano-Ispizua A. Serial intestinal endoscopic examinations of patients with persistent diarrhea after allo-SCT. *Bone Marrow Transplant* 2012;47:694-699.
132. Nomura K, Iizuka T, Kaji D, Yamamoto H, Kuribayashi Y, Kimura R, Yamada A, Furuhashi T, Yamashita S, Kikuchi D, Matsui A, Mitani T, Ogawa O, Hoteya S, Ota Y, Taniguchi S, Kaise M. Clinicopathological features of patients with acute graft-versus-host disease of the upper digestive tract. *J Gastroenterol Hepatol* 2014;29:1867-1872.
133. Abraham J, Janin A, Gornet JM, Peffault dL, Robin M, Xhaard A, de Fontbrune FS, Mary JY, Allez M, Porcher R, Socie G. Clinical severity scores in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Transplantation* 2014;97:965-971.
134. Velasco-Guardado A, Lopez-Corral L, Perez-Simon JA, Caballero-Velazquez T, Flores-Corral T, Caballero-Barrigon D, Rodriguez-Perez A. *Helicobacter pylori* infection and graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:765-769.
135. Larussa T, Leone I, Suraci E, Nazionale I, Procopio T, Conforti F, Abenavoli L, Hribal ML, Imeneo M, Luzzo F. Enhanced Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in *Helicobacter pylori*-Infected Human Gastric Mucosa Modulates Th1/Th2 Pathway and Interleukin 17 Production. *Helicobacter* 2014.

136. Chen Y, Blaser MJ. Inverse associations of *Helicobacter pylori* with asthma and allergy. *Arch Intern Med* 2007;167:821-827.
137. Koyama M, Kuns RD, Olver SD, Raffelt NC, Wilson YA, Don AL, Lineburg KE, Cheong M, Robb RJ, Markey KA, Varelias A, Malissen B, Hammerling GJ, Clouston AD, Engwerda CR, Bhat P, MacDonald KP, Hill GR. Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat Med* 2012;18:135-142.
138. Tawara I, Koyama M, Liu C, Toubai T, Thomas D, Evers R, Chockley P, Nieves E, Sun Y, Lowler KP, Malter C, Nishimoto N, Hill GR, Reddy P. Interleukin-6 modulates graft-versus-host responses after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Cancer Res* 2011;17:77-88.
139. Chakraverty R, Cote D, Buchli J, Cotter P, Hsu R, Zhao G, Sachs T, Pitsillides CM, Bronson R, Means T, Lin C, Sykes M. An inflammatory checkpoint regulates recruitment of graft-versus-host reactive T cells to peripheral tissues. *J Exp Med* 2006;203:2021-2031.
140. Gisbert JP, Calvet X, Bermejo F, Boixeda D, Bory F, Bujanda L, Castro-Fernandez M, Dominguez-Munoz E, Elizalde JI, Forne M, Gene E, Gomollon F, Lanas A, Martin dA, McNicholl AG, Mearin F, Molina-Infante J, Montoro M, Pajares JM, Perez-Aisa A, Perez-Trallero E, Sanchez-Delgado J. [III Spanish Consensus Conference on *Helicobacter pylori* infection]. *Gastroenterol Hepatol* 2013;36:340-374.





## 8. ANEXOS

ANEXO 1: Aprobación del estudio por parte del Comité Ético del Hospital Universitario de Salamanca.

**HOSPITAL  
UNIVERSITARIO  
DE SALAMANCA**  
Paseo de San Vicente, 58-182  
37007 Salamanca  
Comité Ético de Investigación Clínica  
Teléfono: 923 29 15 15

  
E-mail: comite.etico.husa@saludcastillayleon.es

**EL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DEL AREA DE SALUD DE  
SALAMANCA,**

**INFORMA:**

Que el Proyecto de Investigación presentado por el Dr. Antonio Velasco Guardado y la Dra. Lucía López Corral,

Titulado:

**"ESTUDIO PEEICH: NUEVAS TÉCNICAS ENDOSCÓPICAS EN LA ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUESPED Y SU ASOCIACIÓN CON LA INFECCIÓN POR HELICOBACTER PYLORI".**

Que presentan como investigadores responsables y realizarán conjuntamente los Servicio de Digestivo y Hematología de este Centro, SE AJUSTA A LAS NORMAS ÉTICAS Y DE BUENA PRÁCTICA CLÍNICA, establecidas para tales estudios.

Y para que conste lo firma en Salamanca con fecha 13 de julio de 2012.

**EL SECRETARIO**  
  
HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA  
COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA

Fdo.: Dr. Ignacio Dávila González

## ANEXO 2: Consentimiento Informado del estudio PEEICH.

### HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

**TÍTULO DEL ESTUDIO:** NUEVAS TÉCNICAS ENDOSCÓPICAS Y LA RELACIÓN DE HELICOBACTER PYLORI EN LA ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUESPED

**INVESTIGADORES PRINCIPALES:** Dr. Antonio Velasco Guardado y Dra. Lucía López Corral.

**INVESTIGADORES COLABORADORES:** Dr. Antonio Rodríguez Pérez, Dra. Dolores Caballero Barrigón, Dra. Ana Mora Soler.

#### INTRODUCCIÓN

Una de las complicaciones más importantes y más graves del trasplante de células hematopoyéticas es la denominada Enfermedad de Injerto Contra Huésped (EICH) que consiste en un “ataque” de las células que se han trasplantado del donante contra algunos tejidos del receptor (usted). Los tejidos principalmente afectados son la piel, el tracto gastrointestinal (boca, esófago, estómago, intestino delgado y grueso) y el hígado, aunque si esta enfermedad se cronifica puede afectar a otros órganos importantes como el pulmón, riñón o corazón. Este estudio intenta diagnosticar precozmente la EICH, principalmente cuando afecta al tracto gastrointestinal, y valorar la implicación del *Helicobacter pylori* en el desarrollo de la enfermedad (es una bacteria que habita el tubo digestivo de una gran parte de la población y que se ha relacionado con la patología ulcerosa y ciertos tumores), de tal manera que podamos tratar antes y mejor la enfermedad e impedir que esta progrese a otros tejidos. Por el momento, se desconoce qué papel juega esta bacteria en el desarrollo y en la evolución de la Enfermedad de Injerto Contra Huésped. También desconocemos qué utilidad tiene la Ecoendoscopia (técnica novedosa que combina en el mismo procedimiento endoscopia y ecografía) en el diagnóstico de la Enfermedad de Injerto Contra Huésped.

Por favor, lea atentamente este formulario de consentimiento y coméntelo con su médico del estudio. Puede reflexionar sobre éste el tiempo que necesite o comentarlo con su familia o amigos antes de tomar una decisión. Si decide que quiere participar en este estudio le pediremos que firme el formulario de consentimiento para confirmar que ha sido informado sobre este estudio, que se ha contestado a todas sus preguntas y que acepta participar.

Firma del paciente:.....

Fecha.....

Página 1



## INFORMACIÓN SOBRE EL ESTUDIO, PROCEDIMIENTOS Y RESPONSABILIDADES DEL SUJETO

Este estudio se realiza en el Hospital Universitario de Salamanca y participan en él los Servicios de Hematología y Digestivo. Para participar en el estudio se requiere ser mayor de edad y ser candidato a recibir un trasplante de células hematopoyéticas.

En primer lugar usted deberá responder a un cuestionario sencillo sobre patología digestiva. Posteriormente se le realizará un test de aliento (técnica sencilla, no invasiva, fácil de realizar y sin posibles efectos perjudiciales para el paciente). El equipo de hematología realizará las pruebas necesarias y habituales previas al trasplante y posteriormente se realizará el trasplante. Este estudio no implica la modificación de ningún procedimiento diagnóstico o terapéutico que requiera el trasplante. Posteriormente durante el seguimiento, si usted comienza con síntomas digestivos que al responsable de Hematología sugieran una Enfermedad de Injerto Contra Huésped, se le realizará una técnica endoscópica doble bajo sedación con toma de biopsias para estudiar la afectación del tubo digestivo (esófago, estómago y duodeno) por dicha enfermedad. Este procedimiento denominado endoscopia digestiva alta o gastroscopia es el que se realiza habitualmente para diagnosticar esta complicación. En este caso se realizaría una endoscopia convencional seguida de una Ecoendoscopia que es una técnica novedosa que combina endoscopia y ecografía, ambas bajo la misma sedación y durante el mismo procedimiento.

En caso de presentar en la endoscopia signos que sugieran Enfermedad de Injerto Contra Huésped, se tomarán biopsias que confirmarán el diagnóstico y se iniciará el tratamiento que su Hematólogo considere adecuado. En el caso en que usted no presente ningún síntoma o signo que sugiera la presencia de Enfermedad de Injerto contra Huesped, se le realizará un nuevo test de aliento pasado 100 días del trasplante.

### RIESGOS

Se le informará debidamente antes de cualquier procedimiento de los riesgos de cada uno de ellos y se le dará un documento de consentimiento informado previo a la realización del mismo (tanto para el test de aliento, como para la endoscopia).

### GASTOS, PAGO POR LA PARTICIPACIÓN Y BENEFICIOS

La participación en el estudio no le supondrá coste alguno. Usted no recibirá ninguna compensación económica, ni directa ni indirecta, por participar en este estudio. La recogida de su información para este estudio de registro de datos no implica riesgo o beneficio alguno para usted. Los datos obtenidos pueden ser de interés científico y por tanto de utilidad para otras personas que requieran el mismo tipo de tratamiento.

Firma del paciente:.....

Fecha.....

Página 2

### **PREGUNTAS**

Si tiene cualquier pregunta relacionada con su participación en este estudio, con sus derechos como participante o si en cualquier momento piensa que ha padecido una reacción adversa del medicamento que está tomando, póngase en contacto con:

Nombre del médico a contactar para este estudio: Dr. Antonio Velasco Guardado

Teléfono de contacto: 923291400 – 923291100 (extensión 979).

### **CONFIDENCIALIDAD**

Los investigadores principales garantizarán la confidencialidad de los datos de los sujetos y velará porque se cumpla en todo momento con lo establecido por la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. En este Estudio se recogerán datos relativos a su salud de su Historia Clínica y/u otros registros del Estudio. La información recogida será únicamente empleada para investigación clínica. Los documentos e información que de usted pudieran recogerse durante la realización del Estudio se manejarán de forma estrictamente confidencial y serán, en cualquier caso, tratados de forma anónima, puesto que no se recogerán ni su nombre, ni sus iniciales, ni cualquier otro dato que permita identificarle. Por tanto la publicación de los resultados del Estudio en ningún caso podrá permitir su identificación. Conforme a las disposiciones legales, usted tiene derecho a conocer los datos del estudio que sobre usted se recojan, a obtener una copia, y a conocer el uso que puedan darse a los mismos. Dicha información le será suministrada por el investigador.

### **ABANDONO/PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA**

El investigador puede interrumpir su participación en el estudio sin su consentimiento en cualquier momento. Su participación en este estudio es voluntaria. Usted tiene derecho a no participar en este estudio y si participa, tiene derecho a retirar su consentimiento y suspender su participación en cualquier momento. En ninguno de los dos casos su decisión supondrá perjuicio alguno ni pérdida de beneficios a los que legítimamente tiene derecho en el cuidado de su salud. Usted podrá abandonar el estudio en cualquier momento de su desarrollo. En el supuesto de que Ud. se retirara del mismo, los datos clínicos recogidos hasta ese momento podrán seguir siendo utilizados en los términos previstos en el presente documento, pero bajo ningún aspecto se recogerán datos clínicos nuevos y posteriores a su retirada del estudio. Si decide suspender su participación en el estudio debe informar primero a su médico del estudio.

Firma del paciente:.....

Fecha.....

Página 3

**CONSENTIMIENTO**

He leído este formulario de consentimiento cuyo contenido me fue explicado. Mis preguntas han sido contestadas. Accedo voluntariamente a participar en este estudio de investigación y recibiré una copia firmada y fechada de este formulario de consentimiento. Certifico que no participo actualmente en otro estudio de investigación y que he hablado con el médico del estudio sobre las consecuencias de tal actividad.

Con la firma de este formulario de consentimiento no renuncio a ninguno de mis derechos legales. Al firmar este impreso de consentimiento informado, yo en mi propio nombre o a través de representante en su caso, autorizo el acceso a mis datos clínicos en los términos expuestos en este documento.

\_\_\_\_\_  
Firma del sujeto

\_\_\_\_\_  
Fecha: dd/mm/aaaa

\_\_\_\_\_  
Nombre del sujeto en letra de imprenta

\_\_\_\_\_  
Firma del representante legal (si fuera necesario)

\_\_\_\_\_  
Fecha: dd/mm/aaaa

\_\_\_\_\_  
Nombre del representante legal en letra de imprenta (si fuera necesario)

\_\_\_\_\_  
Firma del investigador que explica el consentimiento

\_\_\_\_\_  
Fecha: dd/mm/aaaa

\_\_\_\_\_  
Nombre del investigador que explica el consentimiento en letra de imprenta

\_\_\_\_\_  
Firma del paciente:.....

\_\_\_\_\_  
Fecha.....

\_\_\_\_\_  
Página 4

ANEXO 3: Encuesta sobre historia previa de ulcus péptico o posibles tratamientos erradicadores de HP.

**ESTUDIO PEEICH**

PACIENTE NÚMERO:.....

¿Ha tenido antecedentes de úlcera gástrica o duodenal?

SI  ¿Cuándo?..... NO

¿Ha recibido alguna vez tratamiento con antibióticos para la úlcera gástrica o duodenal?

SI  ¿Cuándo?..... NO

¿Ha recibido tratamiento antibiótico para eliminar una bacteria del estómago llamada *Helicobacter pylori*?

SI  Cuándo?..... NO

¿Toma actualmente alguna medicación para el estómago o la acidez?

SI  ¿Cuál?..... NO