



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
UNIDAD DE ATENCIÓN MÉDICA
COORDINACIÓN DE UNIDADES MÉDICAS DE ALTA ESPECIALIDAD
U.M.A.E. ESPECIALIDADES "DR. ANTONIO FRAGA MOURET"
CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA MÉXICO D. F.

DEPARTAMENTO DE HEMATOLOGÍA.

TESIS PARA OBTENER EL DIPLOMA DE HEMATÓLOGO QUE PRESENTA

DRA. FLOR DEL CARMEN PEREZ RETIGUIN

Residente del tercer año de Hematología

Unidad Médica de Alta Especialidad

Hospital de Especialidades "Dr. Antonio Fraga Mouret" CMN "La Raza"

**" Movilización de los linfocitos T $\gamma\delta$ en el donador relacionado de
células tallo periféricas"**

ASESOR DE TESIS:

Dr. Jorge Vela Ojeda



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE AUTORIZACIÓN

Dr. Jesús Arenas Osuna

Jefe de la División de Educación en Salud
UMAE, Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret”
Centro Médico Nacional “La Raza”

Dr. Jorge Vela Ojeda

Jefe del Servicio de Hematología
UMAE, Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret”
Centro Médico Nacional “La Raza”

Dra . Flor del Carmen Pérez Retiguín

Residente de tercer año de Hematología

INDICE.	Pag.
INDICE DE FIGURAS	II
INDICE DE TABLAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	VI-VII
ABSTRAC	VIII
I. INTRODUCCIÓN	1
Antecedentes.	
Movilización de células tallo periféricas	
Función antitumoral de los linfocitos T $\gamma\delta$	
Función de los linfocitos T en el trasplante alogénico de células tallo periféricas.	
I.1 JUSTIFICACION	7
I.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
I.3 HIPÓTESIS	9
I.4 OBJETIVOS	10
II PACIENTES Y METODOS	11
III ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
III RESULTADOS	20
IV DISCUSIÓN DE RESULTADOS	27
V CONCLUSIONES	30
VII BIBLIOGRAFÍA	31
VIII ANEXOS	34

INDICE DE FIGURAS

	PAG
FIGURA 1. ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS CD 3+	17-18
FIGURA 2. GRAFICA DE LA MOVILIZACION DE CELULAS NUCLEADAS EN EL DONADOR.	24
FIGURA 3. GRAFICA DE LA MOVILIZACION DE LOS LINFOCITOS T $\gamma\delta$ + EN EL DONADOR.	24
FIGURA 4. GRAFICA COMPARATIVA DE LA CANTIDAD BASAL DE LOS LINFOCITOS T $\gamma\delta$ + EN EL PACIENTE Y DONADOR.	26

INDICE DE TABLAS

	PAG
TABLA I. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES Y DONADORES	20
TABLA 2. MEDIA Y DESVIACIÓN ESTANDAR DE CN, CD3+ Y T $\gamma\delta$ + EN MUESTRA BASAL Y PREVIA DEL DONADOR .	21
TABLA 3. COMPARACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFERICA ANTES Y DESPUÉS DE G-CSF.	22
TABLA 4. COMPARACIÓN ENTRE CELULAS DE PACIENTE Y DONA- DOR	25
TABLA 5. VALORES OBTENIDOS DE LA COMPARACION DE CN, INFOCITOS CD3+ y T $\gamma\delta$ EN LAS MUESTRAS BASALES DE PACIENTES Y DONADORES.	25

Pérez-Retiguín FC, García-Chávez J, Vela-Ojeda J. **Movilización de los linfocitos T $\gamma\delta$ en el donador relacionado de células tallo periféricas.**

INTRODUCCION: Las células T $\gamma\delta$ representan una población distinta de los linfocitos T. La localización de estos linfocitos, es muy abundante en los sitios afectados por la Enfermedad Injerto Contra Huésped (EICH). Varios estudios se han enfocado en el papel que juegan estas células en esta enfermedad.

OBJETIVO: Evaluar si los linfocitos T $\gamma\delta$ son movilizados después de la administración de Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF).

PACIENTES Y METODOS: Se estudiaron 12 pacientes y 12 donadores de células tallo hematopoyéticas, durante el proceso de la movilización. Los donadores, 8 hombres y 4 mujeres, fueron movilizados con G-CSF a dosis de 10 μ g/Kg/día durante 5 días. Se les tomó muestra basal de sangre periférica (BSP) y también se tomó muestra de sangre periférica al día 5 y 6 de la movilización (SPM), así como de las bolsas de aféresis. Por citometría de flujo, cuantificamos los linfocitos T CD3+ $\gamma\delta$ +

RESULTADOS: Observamos un incremento (10⁶/L) en las SPM con respecto a las BSP, con una media de 25.10 $\pm$ 16.6 (SD) vs 64.17, $\pm$ 52.69 y disminución del total de linfocitos T $\gamma\delta$ en la BSP de los pacientes con respecto a la BSP de los donadores, con una media de 10.19 $\pm$ 9.4 vs 25.10 $\pm$ 16.67.

CONCLUSIONES: En este estudio se muestra que el G-CSF estimula la movilización de los linfocitos T $\gamma\delta$ de forma significativa y que estos linfocitos se encuentran en menor cantidad en los pacientes con respecto al donador sano.

PALABRAS CLAVE: Linfocitos T $\gamma\delta$, movilización, G-CSF.

Pérez-Retiguín FC, García-Chávez J, Vela-Ojeda J. **Mobilización de los linfocitos T $\gamma\delta$ en el donador relacionado de células tallo periféricas.**

ABSTRACT

$\gamma\delta$ T cells represent a distinct subset of T cells that is localized in target tissues of graft versus-host disease (GVHD). Several recent studies have focused on the role of these cells in this complication.

Objective: To evaluate if $\gamma\delta$ T cells are mobilized after the administration of Granulocyte- Colony Stimulating Factor (G-CSF).

Material and Methods: We studied 12 patients and their respective donors who underwent stem cell transplantation. Donors (8 men and 4 women), were mobilized with G-CSF 10 μ g/Kg/day for five days. Basal Peripheral Blood (BPB) samples from donors were taken, as well as samples from Mobilized Peripheral Blood (MPB) and apheresis products. Using flow cytometry, we quantified CD3+ and $\gamma\delta$ T cells.

Results: We observed an increase ($10^6/L$) in MPB with respect to BPB (25.10 ± 16.6 vs 64.17 ± 52.69 , $P < 0.03$) and a decrease in BPN of patients with respect to BPB of donors (10.19 ± 9.4 vs 25.10 ± 16.67 , $P < 0.01$).

Conclusions: This study showed that G-CSF significantly induces peripheral blood mobilization of $\gamma\delta$ T cells.

I. INTRODUCCION

I.1. ANTECEDENTES

La era moderna del trasplante de células tallo periféricas, inició posterior a los hallazgos biológicos encontrados como consecuencia de las dosis letales de irradiación utilizadas durante la 2da. Guerra Mundial. Durante este periodo se descubrió que la médula ósea, era el órgano más susceptible a la irradiación y que la muerte asociada con la exposición a dosis letales de irradiación se debía a una falla en la médula ósea. En 1949, Jacobson y colaboradores, demostraron en un modelo murino, que ante una exposición de una dosis letal de irradiación, el ratón podría sobrevivir si se infundían células de bazo y posteriormente Lorenz lo describe con células de médula ósea. Investigadores y clínicos dedicados al estudio de la biología de la irradiación, inmunología, oncología y hematología, ante estos hallazgos, consideraron que el trasplante de células hematopoyéticas podría dar lugar a todos los linajes de células hematopoyéticas y que esto implicaba una estrategia de tratamiento para los humanos con enfermedades hematológicas que cursaran con falla medular ⁽¹⁾.

En 1957, el Dr. Donald Thomas, realizó el primer trasplante de médula ósea (TMO) a un paciente con leucemia linfoblástica aguda que recibió una dosis alta de irradiación corporal total (ICT) y se le practicó un TMO de su hermano gemelo, el paciente tuvo una restauración de la hematopoyesis exitosa, sin embargo el presentó recaída de la enfermedad, demostrando que el trasplante de médula ósea del donador sano compatible, rescata a el paciente de la

radiación letal, pero no puede ser suficiente para eliminar la enfermedad tumoral. Se observó también que la irradiación por si sola, no eliminaba las células leucémicas y se consideró que la administración de la quimioterapia, previa al trasplante, podría ser necesaria ⁽²⁾.

Hasta hace 50 años, el papel del trasplante alogénico de células tallo periféricas era considerado como un último recurso terapéutico debido a las múltiples complicaciones que los pacientes presentaban y a la dificultad que se tenía para la obtención de médula ósea del donador; sin embargo el desarrollo de los sucesivos trasplantes de células tallo hematopoyéticas, como una modalidad terapéutica y de investigación, ha beneficiado de forma muy importante, el curso evolutivo del paciente hemato-oncológico, considerándose en estos momentos una herramienta terapéutica con opciones curativas de enfermedades malignas ó enfermedades genéticas.

MOVILIZACIÓN DE CELULAS TALLO PERIFERICAS

Las células tallo fueron detectadas en sangre periférica de ratón en 1962 y en humanos en 1971 ⁽³⁾. El procedimiento de aféresis hizo posible la obtención de un gran número de progenitores celulares desde la sangre periférica. El primer trasplante alogénico con progenitores celulares en sangre periférica fue reportado en 1989 y su uso llegó a ser más común después de 1995, ya que esta forma de obtención de células tallo periféricas (CTP) mostró más ventajas en relación al TMO ⁽³⁾.

En condiciones basales, el número de progenitores hematopoyéticos celulares son bajos en la circulación. Actualmente, se dispone de las citocinas hematopoyéticas como Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF) y el Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF) los cuales son agentes que inducen la movilización de progenitores celulares a la sangre periférica. La disponibilidad de estos factores de crecimiento para la movilización, ha permitido la realización de un mayor número de trasplantes exitosos de células tallo periféricas, debido fundamentalmente a que se infunde una mayor dosis de estas células. ⁽⁴⁾

El G-CSF es el factor de crecimiento más utilizado para estos fines, y la dosis es de 10 ug/Kg/día/5 días por vía subcutánea . En un estudio aleatorizado se comparó la donación de CTP con las de MO, y los productos de sangre periférica tenían el doble de células CD34+, 8 veces más células NK y células T que la médula ósea. Se conoce que además de estas células, también se obtienen progenitores mieloides, linfoides, eritroides y megacariocíticos. Sin embargo, no hay estudios hasta el momento que aporten datos en relación a la movilización de las linfocitos T $\gamma\delta$ ⁽⁵⁾.

Los Linfocitos T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$) constituyen aproximadamente el 5% del total de los linfocitos T y exhiben el inmunofenotipo CD4 y CD8 negativos, abundan especialmente en los epitelios mucosos como intestino, lengua, piel, esófago,

traquea, pulmones, epitelio genital y constituyen solo una pequeña parte de las células T en sangre periférica ⁽⁶⁾.

Las $LT\gamma\delta$ se han estudiado ampliamente en relación a su función inmunológica, sin embargo aun no esta bien definido su papel con precisión. Entre otras cosas, se han considerado como células de “1ra. línea de defensa”, “células reguladoras” y “ células de función intermedia entre inmunidad innata y adaptativa” ⁽⁷⁾.

Actualmente se considera que hay 2 subtipos de estos linfocitos:

1. Linfocitos T $V\gamma9 V\delta2+$: representa la mayoría de los linfocitos T $\gamma\delta$ de sangre periférica. Esta variedad juega un papel muy importante en la defensa contra los patógenos intracelulares y neoplasias hematológicas . Se ha demostrado en estudios in vitro que estas células activadas son capaces de destruir líneas celulares de Linfoma y Mieloma ⁽⁷⁾.
2. Linfocitos T $V\delta1+$: son más abundantes en los tejidos epiteliales, donde pueden actuar como 1ra. línea de defensa contra infecciones y enfermedades malignas ⁽⁷⁾.

Un estudio reciente mostró que los $LT\gamma\delta V\delta2+$ activadas tienen función de células presentadoras de antígenos (CPAs), aunque este estudio solo se enfocó a este subtipo de células y hace falta determinar si todas las variedades de $CT\gamma\delta$

tienen la misma capacidad de CPAs o solo es esta variedad ⁽⁸⁾. En otros estudios sobre la respuesta inflamatoria, se ha demostrado que las $CT\gamma\delta$ interaccionan con macrófagos, granulocitos y células dendríticas. Los $LT\gamma\delta$ también parecen ser efectivas en la erradicación de células infectadas por el Virus Epstein Barr (VEB) en pacientes con enfermedades linfoproliferativas posterior a trasplante de médula ósea⁽⁹⁾.

En contraste con los linfocitos $T\alpha\beta$, los $LT\gamma\delta$, tienen potencial para expansión policlonal, sin estímulo previo, por tanto la actividad de estas células no está restringida al MHC y son capaces de reconocer una amplia gama de proteínas y antígenos no proteicos ^(9,10).

Estudios *in vitro* e *in vivo*, han demostrado que compuestos aminobifosfonatos, tienen homología estructural con el ligando TCR $\gamma\delta$, induciendo activación y proliferación de $LT\gamma\delta$ circulantes dependientes de IL-2. Ante esta evidencia se ha sugerido que la expansión selectiva de las células $T\gamma\delta$ contribuye al efecto antitumoral documentado en estas drogas. En relación a este efecto, el subtipo celular $V\gamma9^+ CD4^- CD8^-$ es eficientemente expandido en sangre periférica, en presencia de zoledronato ⁽¹¹⁾.

FUNCION ANTITUMORAL DE LOS LINFOCITOS $T\gamma\delta$

En relación a su actividad antitumoral, los linfocitos $T\gamma\delta$ pueden infiltrar tumores sólidos y exhibir una actividad selectiva lítica contra una variedad

tumoral ⁽¹²⁾. Tanto las células T $\gamma\delta$ residentes como circulantes, expresan un distinto patrón de receptores de quimiocinas, el cual potencialmente les permite extravasarse y migrar hacia la matriz extracelular y atacar el sitio tumoral en respuesta al estímulo ^(6,11,13).

FUNCION DE LAS CELULAS T EN EL TRASPLANTE ALOGENICO DE CELULAS TALLO PERIFERICAS .

En relación al trasplante de células tallo periféricas (TCTP), las células T infundidas, sirven para erradicar células malignas, así como células residuales inmunológicamente competentes , reduciendo el riesgo de rechazo de injerto y favoreciendo la respuesta injerto contra tumor(RICT), sin embargo la mayor actividad de estas células también favorece el desarrollo de enfermedad injerto contra huésped (EICH). No se conoce hasta el momento la función específica de las células T $\gamma\delta$ en el proceso del trasplante ^(14, 15).

Estudios experimentales en modelos murinos mostraron que la depleción de las células T $\gamma\delta$ en los ratones receptores B6 por administración de anticuerpo monoclonal anti-TCR disminuyó la incidencia de EICH y tuvieron una marcada mejoría de la sobrevida en comparación con los controles. También se demostró que estas células favorecen la actividad alo-estimuladora de las células dendríticas incrementando la proliferación de las células T alogénicas, demostrando que las células T $\gamma\delta$ juegan un papel crítico en la patogénesis de la enfermedad injerto contra huésped al menos en el ratón ⁽¹⁶⁾.

1.1 JUSTIFICACIÓN

Actualmente la disponibilidad de agentes inductores de la movilización de progenitores celulares ha permitido la realización del trasplante de células tallo periféricas, el cual por estudios comparativos con el TMO, se ha visto que tiene más ventajas en relación a la cantidad de células tallo obtenidas, relacionándose también con una recuperación más temprana de los neutrófilos y plaquetas posterior al trasplante, aunque también se vio que hay una mayor incidencia de EICH tanto aguda como crónica. Se observó también que se movilizaban una mayor cantidad de linfocitos T y células NK. Sin embargo, específicamente en relación a los linfocitos T $\gamma\delta$ no hay estudios que aporten datos sobre la función de estas células en la respuesta injerto contra tumor ó en la EICH. Para ello se requiere primero un estudio sobre la movilización de esta subpoblación de linfocitos que permita posteriormente la realización de otros estudios en relación a la función de estas células en los pacientes con trasplante alogénico de CTP.

En base a lo ya descrito, este estudio pretende establecer si los linfocitos T $\gamma\delta$ se movilizan durante la administración de FEC-G en los donadores sanos relacionados de los pacientes en el TCTP como un primer paso y posteriormente en otros estudios, establecer la correlación entre la Supervivencia Global (SG) y Libre de Enfermedad (SLE).

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Durante la movilización con G-CSF, varios progenitores celulares mieloides, linfoides, megariocíticos y eritroides salen a la sangre periférica, juntos con otras células como las NK, dendríticas y linfocitos T y B. Se desconoce hasta el momento si los linfocitos T $\gamma\delta$ se movilizan con la administración de G-CSF, por lo cual surge nuestro siguiente planteamiento: ¿Los linfocitos T $\gamma\delta$ se movilizan durante la administración de FEC-G en el donador sano relacionado de los pacientes con trasplante alogénico de células tallo periféricas?

1.3 HIPÓTESIS

1. La cantidad de células $T \gamma\delta$ en sangre periférica es mayor después de 5 días de la aplicación de FEC-G subcutánea en el donador de células tallo periféricas comparado con la cuenta basal.

1.4 OBJETIVO:

Conocer la cantidad de células $T\gamma\delta$ en sangre periférica el los día 0, 5 y 6 del periodo de movilización con FEC-G administrado al donador a dosis de 10 ug/kg/día/5 días.

II. PACIENTES Y MÉTODOS.

Este trabajo fue realizado en la UMAE , ESPECIALIDADES “DR. ANTONIO FRAGA MOURET” del Centro Médico Nacional La Raza, del Instituto Mexicano del Seguro Social, en la Unidad de Trasplante de Médula Osea del Departamento de Hematología. Se incluyeron al protocolo, 12 donadores con sus respectivos pacientes con enfermedades hematológicas, aceptados por el comité de trasplante en base a una valoración previa del caso y se autorizó su ingreso al protocolo por medio de una carta de consentimiento informado.

Los criterios de inclusión para los donadores, fueron los siguientes:

- 1.- Donadores de células tallo hematopoyéticas con protocolo completo del programa de Transplante en fase de movilización.
- 2.- Hombres y mujeres
- 3.- Edad mayor de 16 años.
- 4.- Pruebas para VIH, Hepatitis B, C y CMV negativas.
- 5.- Carta de consentimiento informado (anexo 1).

CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN

- 1.- Antecedentes de intolerancia al FEC-G
- 2.- Embarazo

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- 1.- Abandono del proyecto por parte del donador.
- 2.- Intolerancia al FEC-G.
- 3.- Embarazo

PROCEDIMIENTO GENERAL DEL TRABAJO:

A todos los donadores y pacientes que cumplieron los criterios de inclusión, se les tomó una muestra basal de sangre periférica (SPB), después se inició el proceso de la movilización de la siguiente forma:

MOVILIZACIÓN:

Para la movilización, al donador se le administró FEC-G a dosis de 10 ug/kg/día x 5 días, iniciando 6 días previos al TCTP. Los primeros 3 días se aplicó la dosis correspondiente a las 22: 00Hrs del día. El día 5 y 6 se administró la dosis a las 04:00Hrs a.m. y a las 08:00Hrs en la unidad de aféresis se inició la recolección de células tallo periféricas (CTP) , correspondiendo a los días 5 y 6 del periodo de la movilización.

Previo al proceso de aféresis en el donador, se tomó una 2da. muestra de sangre periférica, de aprox. 5ml (muestra previa), para evaluar la movilización. Una vez iniciado la recolección de las CTP por aféresis, en el donador se procesaron entre 10 a 15L de sangre, con el fin de obtener un concentrado de células mononucleares (CMN) en un volumen de 50 a 55 ml. Este procedimiento fue realizado por el servicio de aféresis del hospital.

A este producto se cuantificaron las células CD34+ infundidas al paciente, teniendo como valor mínimo un total de $2.0 \times 10^{(6)}$ /Kg de peso, siendo sometido a una segundo proceso de aféresis en caso de no lograrse el mínimo requerido

para el trasplante. Las células se infundieron al paciente, una vez completado el esquema de acondicionamiento, considerándose este día como “día cero”, a partir del cual se monitorizó el paciente para evaluar la restauración de la hematopoyesis, posibles recaídas y enfermedad injerto contra huésped.

Del total de los 12 donadores y 12 pacientes, en ambos grupos se estudió el efecto del G-CSF en la población de las células nucleadas y los linfocitos T $\gamma\delta$. Se determinó también la cantidad de estas células en las bolsas de aféresis obtenidas.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras basal de sangre periférica (SPB) y sangre periférica movilizada (SPM), se obtuvieron a partir de 10mL de sangre periférica heparinizada, mientras que la muestra de aféresis se obtuvo tomando 1.0mL de la bolsa del producto de aféresis. Todas las muestras fueron procesadas de la misma forma y solo se realizaron los ajustes necesarios a las muestras de SPM y aféresis.

A partir de muestras de sangre periférica provenientes de los donadores y pacientes, se tomó una alícuota de 3ml, previa homogenización y partiendo de este volumen, se realizaron las siguientes determinaciones:

- Cuantificación de las células nucleadas en el analizador automático para BH Cell Dyn 3000 ($\times 10^6$)/mL).

- Análisis morfológico con la tinción de Wright determinando la cantidad de células con morfología linfocítica y su relación con la cantidad de células progenitoras hematopoyéticas por unidad.

- Se ajustó la cantidad de células nucleadas a 1×10^6 /100 ml de PBS a partir de la cual se tomaron alícuotas de 150 μ l que se depositaron en los tubos de Falcon; posteriormente se determinó la cantidad de células positivas para TCRs $\gamma\delta$ por citometría de flujo . Las muestras fueron adquiridas en un total de 100,000 eventos.

Con el objetivo de determinar las subpoblaciones celulares, se marcaron una serie de tubos para citómetro (FALCON, Becton Dickinson, Franklin lakes, EUA) realizando tinciones dobles.

- Control de isotipo
- CD 34 acoplado a Ficoeritrina (PE)
- CD 3 acoplado a FITC
- TCR $\gamma\delta$ acoplado a PE

Preparación de las muestras para el análisis por citometría de flujo.

A. Tinción:

En un tubo Falcon se colocaron $1.5 \times 10^{(6)}$ células mononucleares viables en 100 μ L de amortiguador de fosfatos y se les adicionó 20 μ L de anticuerpo marcado con isotiocianato de fluoresceína ó ficoeritrina, posteriormente se mezcló e incubó durante 20 minutos a 4°C en la oscuridad durante 20min y transcurrido el tiempo se lisaron los eritrocitos con 1mL de solución de lisis (1:10) (BECTON DICKINSON), mezclándose e incubándose después durante 10 min. a temperatura ambiente.

4. Al terminar la lisis, se centrifugaron a 300 x g durante otros 5 min., se decantaron y se eliminó el sobrenadante, adicionándose 0.8mL de amortiguador de fosfatos más 0.2mL de paraformaldehído al 1% en solución salina isotónica.

5. Se resuspendió en vortex a baja velocidad y finalmente con el tubo a esas condiciones se adquirieron los datos.

B. Adquisición de datos.

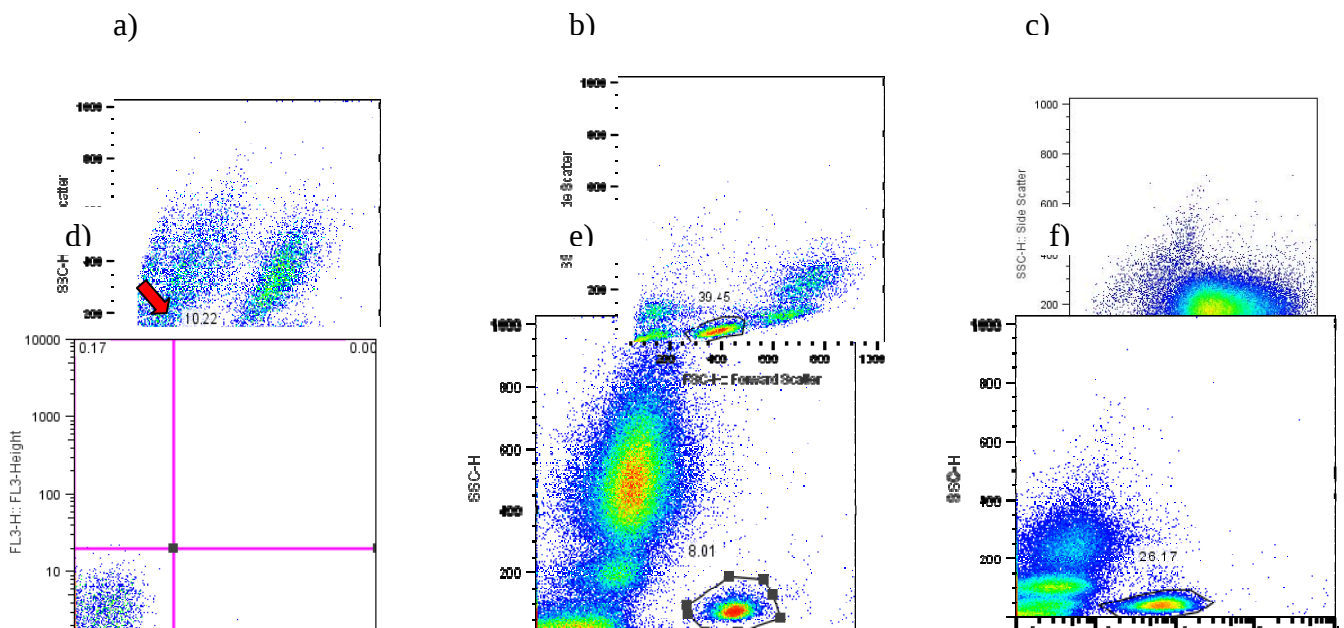
a- Se adquirieron los datos en el programa de “Cell Quest Pro” versión 3.2.1 “ Apple System” 7.6.1. Utilizando el tubo de control de isotipo (tubo1), se ajustaron los eventos en un gráfico lineal de tamaño (FSC) contra granularidad (SSC), se dibujó una ventana en la región linfocítica (R1) con valores que oscilaban entre 200 y 400 para FSC y entre 30 a 200 para SSC.

b- La adquisición de las muestras se realizó en un equipo de FACSCalibur (BECTON DICKINSON) seleccionando la región linfóide CD3 + ajustando primero la auto fluorescencia de las células, colocando los marcadores de los cuadrantes en una gráfica de puntos “dot plot” en la escala logarítmica $10^{(1)}$, tanto para el eje de las abscisas (FL2 PE) como para el eje de las ordenadas (FL3 PerCP) , colocando dicha auto fluorescencia en el cuadrante inferior izquierdo en un porcentaje mínimo de 99.4%, ya que el porcentaje de células $T\gamma\delta$ es muy bajo.

C. Análisis.

Se analizaron a partir de las células CD3 + la cantidad de linfocitos T $\gamma\delta$.

Correspondiendo a las células doble positivas en la región del cuadrante superior derecho.



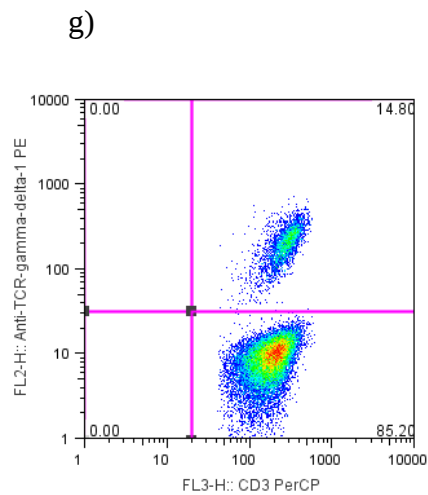


Fig. 1 . Ejemplo de un análisis de subpoblación de linfocitos (SPL). En la fig a, b y c, se presenta un gráfico de tamaño contra granularidad de a) muestra basal, b) cosecha y c) muestra de SPM (sangre periférica movilizada). d) control de autofluorescencia; e y f subpoblación de CD3+, y g) células Tγδ +

Con los porcentajes de cada una de las poblaciones celulares, se calculó el número de células expresado como $10^6/L$ para la muestra basal y la SPM. En el caso de la muestra de aféresis, se calculó el número de células $\times 10^6/Kg$ peso del paciente, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{CN \cdot 10^6}{L} = \frac{CN}{\mu l} \times 10^6$$

$$\frac{Lc \cdot x 10^6}{L} = \frac{CN}{L} \times 10^6 \times \frac{\%Lc}{100}$$

$$\frac{CD3+ \cdot x 10^6}{L} = \frac{CN}{L} \times 10^6 \times \frac{\%CD3+}{100}$$

$$\frac{CT \gamma \delta + \cdot x 10^6}{L} = \frac{CN}{L} \times 10^6 \times \frac{\%CD3+}{100} \times \frac{\%CT \gamma \delta}{100}$$

$$\frac{CD 34+ \cdot x 10^6}{Kg} = \left(\frac{CN}{L} \times 10^3 \times \frac{\%CD3+}{100} \times \frac{\%CT \gamma \delta}{100} \times Vol(ml) \right) / \text{peso del paciente (Kg)}$$

$$\frac{CT \gamma \delta + \cdot x 10^6}{Kg} = \left(\frac{CN}{L} \times 10^3 \times \frac{\%CD3+}{100} \times \frac{\%CT \gamma \delta}{100} \times Vol(ml) \right) / \text{peso del paciente (Kg)}$$

CN = Leucocitos

Lc= Linfocitos

Vol = Volumen del concentrado de CMN obtenido por proceso de aféresis.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la movilización celular se utilizó la prueba T PAREADA para un grupo antes y después.

Tamaño de la muestra 10 pacientes (estudio piloto).

III. RESULTADOS.

Durante el período de 1ro. de mayo del 2006 hasta el 31 de enero del 2007 se incluyeron al estudio 12 donadores sanos histocompatibles y sus respectivos receptores de células tallo. De los 12 pacientes candidatos a trasplante, 8 (66%) pacientes fueron de sexo masculino y 4 (33%) del sexo femenino. De los donadores, 5(41%) fueron de sexo femenino y 7 (58%) del sexo masculino. La edad promedio de los donadores fue de 38.7 años, (rango 24 a 60 años), la edad promedio de los pacientes fue de 38.0 años (rango 25 a 49 años). En la Tabla 1 se muestran las características basales de los sujetos de estudio.

Tabla 1. Características Basales de los Pacientes.

ID	Nombre	Edad P	Sexo P	EDAD DN	SEXO DN	Diagnostico	Cariotipo	Acondicionamiento
1	PBI	30	M	41	F	LGC PH NEG	PH NEG	BUCY-2
2	JDC	49	M	48	F	LGC PH +	PH POSITIVO	BU/FLU
3	GHA	37	M	44	M	LGC FC PH +	PH POS	BUCY-2
4	PLMM	44	F	38	F	LGC PH +	PH +	BU/FLU
5	APA	49	M	38	M	LMA M2	NORMAL	BU/FLU
6	MGP	26	M	24	M	AAG	NL	GAL/CFM
7	JRM	27	F	25	M	AAG	NL	GAL/CFM
8	GMA	36	M	40	M	LMA M2	COMPLEJO	BUCY-2
9	DLCRE	25	M	33	M	LNH	NL	BU/FLU
10	PCJL	36	M	60	F	LMA M5	NL	BUS/FLU
11	GLMG	32	F	29	F	AAG	NL	GAL/CFM
12	GCNA	35	F	37	M	MF	NL	BU/FLU

P= paciente, DN= donador, LGC Ph+ = Leucemia granulocítica crónica con presencia del cromosoma Filadelfia, LMA= Leucemia mieloide aguda, AAG= Anemia aplásica grave, LNH= Linfoma no Hodgkin, MF= Micosis Fungoide, BUCY= Busulfan/Ciclofosfamida, BU/FLU= Busulfan/fludarabine, GAL/CFM= Globulina Antilinfocito/Ciclofosfamida.

SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS Y CELULAS GAMMA DELTA EN LOS DONADORES Y PACIENTES EN ESTADO BASAL.

Después de la inclusión de los donadores en el estudio, el primer paso consistió en determinar cuantitativamente las subpoblaciones de linfocitos CD3+ y linfocitos T $\gamma\delta$ en condiciones basales, es decir previo a la administración de G-SCF. En la Fig. 2 se muestran los valores basales, y en la tabla 2, los valores promedio y las desviaciones estándar de dichas mediciones.

TABLA 2. Medias y desviaciones estandar de las CN, SPL y CT $\gamma\delta$ para los donadores en estado basal.

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
CNDONBAS	6.0333	12	1.5017	.4335
CNPREVDO	31.1367	12	12.2594	3.5390
CD3DONBA	10.7850	12	5.5329	1.5972
CD3PREVD	6.0733	12	5.6923	1.6432
GDDONBAS	3.9242	12	1.9301	.5572
GDPREVDO	4.3900	12	2.9334	.8468
TGDDONBA	25.1067	25.1067	16.6713	4.8126
TGDPREVD	64.1767	12	52.6962	15.2121

CNDONBAS = Células nucleadas de muestra basal del donador, CNPREVDO = Células nucleadas de muestra previa a la movilización del donador, CD3DONBA = Células CD3+ de muestra basal del donador, CD3DONBA = Células CD3+ de muestra previa a movilización del donador, GDDONBAS = Células T $\gamma\delta$ + de muestra basal del donador en %, GDPREVDO = Células T $\gamma\delta$ + de muestra previa del donador en %, TGDDON BAS = Total de CT $\gamma\delta$ + x $10^{(6)}$ /L en muestra basal del donador, TGDPREVD = Total de CT $\gamma\delta$ + x $10^{(6)}$ /L en muestra previa del donador.

EFFECTO DE LA MOVILIZACIÓN DE CELULAS NUCLEADAS Y LINFOCITOS T $\gamma\delta$ DESPUÉS DE 5 Y 6 DÍAS DE LA ADMINISTRACIÓN DE G-CSF.

El siguiente paso del estudio fue evaluar el efecto de G-CSF en las poblaciones celulares estudiadas. A los donadores se les administró G-CSF durante los días 5 y 6 de la movilización para asegurar un número suficiente de células CD34+, por lo tanto el objetivo fue determinar si había una diferencia significativa en la movilización entre los días 5 y 6 de la administración del medicamento. Para lograr este objetivo se realizó una prueba de t pareada para valorar si había alguna diferencia significativa entre la subpoblaciones celulares de la muestra basal y muestras previas del donador. En la tabla 3 se observan los valores obtenidos en esta prueba.

TABLA 3. COMPARACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFERICA ANTES Y DESPUÉS DE G-CSF.

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
CNDONBAS – CNPREVDO	-25.1033	12.3322	3.5600	-32.9388	-17.2679	-7.052	11	.00002
CD3DONBA - CD3PREVD	4.7117	7.2458	2.0917	.1079	9.3154	2.253	11	.046
GDDONBAS – GDPREVDO	-.4658	1.8350	.5297	-1.6317	.7001	-.879	11	.398
TGDDONBA – TGDPREVD	-39.0700	55.7360	16.0896	-74.4829	-3.6571	-2.428	11	.034

CNDONBAS = Células nucleadas de muestra basal del donador, CNPREVDO = Células nucleadas de muestra previa a la movilización del donador, CD3DONBA = Células CD3+ de muestra basal del donador, CD3DONBA = Células CD3+ de muestra previa a movilización del donador, GDDONBAS = Células T $\gamma\delta$ + de muestra basal del donador en %, GDPREVDO = Células T $\gamma\delta$ + de muestra previa del donador en %, TGDDONBA = Total de CT $\gamma\delta$ + x $10^{(6)}$ /L en muestra basal del donador, TGDPREVD = Total de CT $\gamma\delta$ + x $10^{(6)}$ /L en muestra previa del donador.

En esta tabla, se observa para la 1er. comparación de CN basales del donador una media de 6.03 , con una SD $\pm$ 1.50 y en las CN de la muestra previa una media de 31.13 con una SD $\pm$ 12.25, con una diferencia de media -25.10 , (IC 95%, -32.93 a -17.26), con un valor para $t = -7.052$, asociado a un valor de $P < 0.0002$, para células nucleadas, lo cual traduce una diferencia estadísticamente significativa entre estos 2 valores, considerándose que el G-CSF si moviliza estas células . Fig 2.

En cuanto a la comparación de los linfocitos T $\gamma\delta$ en muestra basal y previas del día 5 y 6 de la movilización del donador, se obtuvo en la muestra basal una media de 25.10 con una SD $\pm$ 16.67, mientras que en la muestra previa, se obtuvo una media de 64.17 con una SD $\pm$ 52.69 , con una diferencia de media entre las 2 variables de -39.07 , con una SD de 55.7, con una media de error de SD de 16.08 (IC 95%, -74.48 a -3.65), con un valor de $t=-2.42$, asociado a un valor de $P < 0.03$, con lo cual se considera que si hay diferencia respecto al numero absoluto de linfocitos T $\gamma\delta$ en la muestra basal y en las muestras previas post G-CSF, lo cual traduce que el G-CSF si moviliza estas células a la sangre periférica del donador.

Fig 2.

Movilización CMN donador

Trasplante alogénico

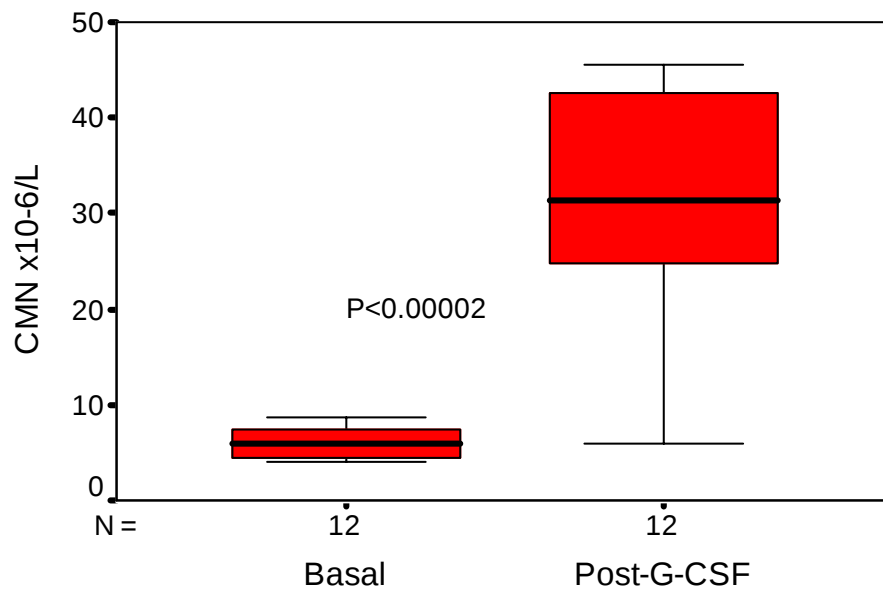
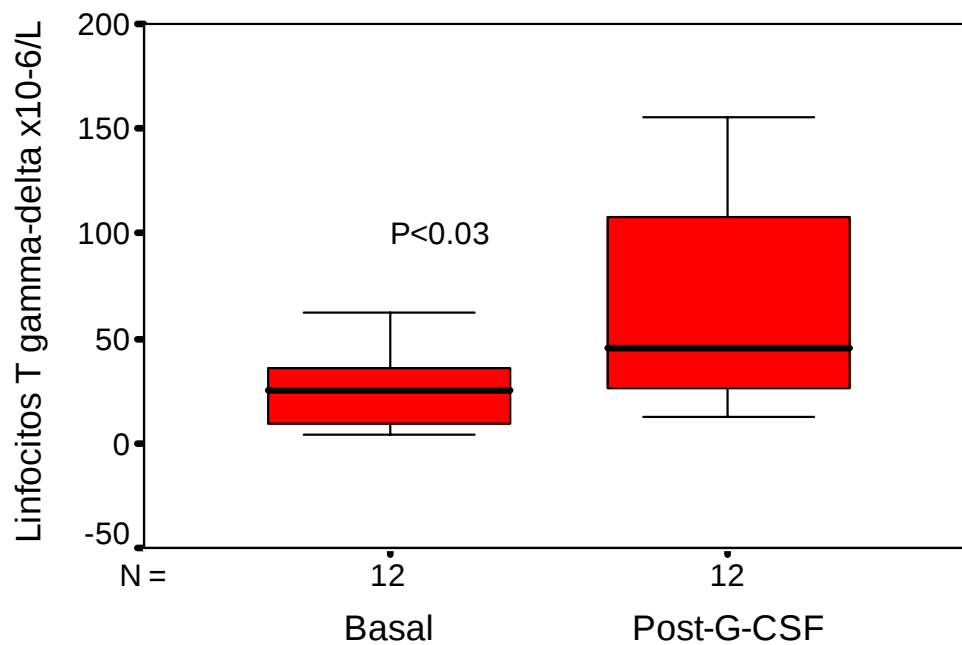


Fig 3.

Movilización linfocitos T gamma-delta

Donador sano alogénico



Se compararon también los valores de células T $\gamma\delta$ en las muestras basales de pacientes y donadores, obteniéndose los siguientes valores:

TABLA 4. COMPARACIÓN DE CELULAS ENTRE PACIENTE Y DONADOR

	Paired Differences					T	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
CNPACBAS - CNDONBAS	-1.5467	2.7163	.7841	-3.2725	.1792	-1.972	11	.074
GDPACBAS - GDDONBAS	-.0517	2.0414	.5893	-1.3487	1.2454	-.088	11	.932
CD3PACBA - CD3DONBA	-2.1508	13.2363	3.8210	-10.5608	6.2591	-.563	11	.585
TGDPACBA - TGDDONBA	-14.9150	17.1088	4.9389	-25.7854	-4.0446	-3.020	11	.012

CNPACBAS = Células nucleadas de muestra basal del paciente, CNDONBAS = Células nucleadas de muestra basal del donador, CD3DONBAS = Células CD3+ de muestra basal del donador, CD3PACBAS = Células CD3+ de muestra basal del paciente, GDDONBA = Células T $\gamma\delta$ + de muestra basal del donador en %, GDPACBA = Células T $\gamma\delta$ + de basal del paciente en %, TGDDONBA = Total de CT $\gamma\delta$ + x $10^{(6)}$ /L en muestra basal del donador, TGDPACBA = Total de CT $\gamma\delta$ + x $10^{(6)}$ /L basal del paciente.

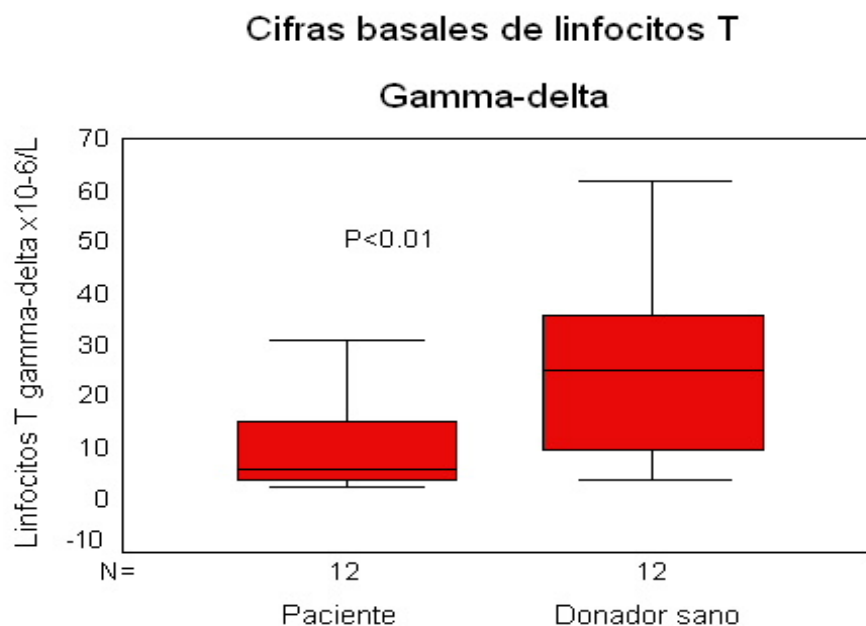
TABLA 5. VALORES OBTENIDOS DE LA COMPARACION DE CN, LINFOCITOS CD3+ y T $\gamma\delta$ EN LAS MUESTRAS BASALES DE PACIENTES Y DONADORES.

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
CNPACBAS	4.4867	12	2.4387	.7040
CNDONBAS	6.0333	12	1.5017	.4335
GDPACBAS	3.8725	12	1.2211	.3525
GDDONBAS	3.9242	12	1.9301	.5572
CD3PACBA	8.6342	12	12.3755	3.5725
CD3DONBA	10.7850	12	5.5329	1.5972
TGDPACBA	10.1917	12	9.4692	2.7335
TGDDONBA	25.1067	12	16.6713	4.8126

CNPACBAS = Células nucleadas de muestra basal del paciente, CNDONBAS = Células nucleadas de muestra basal del donador, CD3DONBAS = Células CD3+ de muestra basal del donador, CD3PACBAS = Células CD3+ de muestra basal del paciente, GDDONBA = Células T $\gamma\delta$ + de muestra basal del donador en %, GDPACBA = Células T $\gamma\delta$ + de basal del paciente en %, TGDDONBA = Total de CT $\gamma\delta$ + x $10^{(6)}$ /L en muestra basal del donador, TGDPACBA = Total de CT $\gamma\delta$ + x $10^{(6)}$ /L basal del paciente.

En esta tabla, se observa que no hay una diferencia significativa entre las CN, Linfocitos T $\gamma\delta$ en % y células CD3+ entre las cifras basales de los donadores y pacientes, sin embargo en la comparación de las cifras absolutas de los linfocitos T $\gamma\delta$, se observa en los pacientes una media de 10.19, con una SD $\pm$ 9.46, mientras que en el donador se obtiene una media de 25.10 con una SD $\pm$ 16.67, con una diferencia de media -14.91 , con una SD $\pm$ 17.10, con una media de error estandar de 4.93, (IC 95%, -25.78 a -4.04), con una $t = 3.020$, asociado a un valor de $P < 0.01$, considerándose que la cifra basal de linfocitos T $\gamma\delta$ en los donadores sanos es mayor en relación a la cifra absoluta de estos linfocitos en los pacientes, con un valor estadísticamente significativo. En la fig. 4, se observa la comparación de las cifras basales de los linfocitos T Gamma-delta del paciente y donador, previo a la administración del G-SCF.

Fig. 4.



IV. DISCUSIÓN

El papel de los linfocitos T $\gamma\delta$ en el trasplante de células tallo periféricas, aun no esta establecido. Considerando la localización de estas células en los sitios dañados en la enfermedad injerto contra huésped (EICH), en estudios previos, se crearon modelos murinos para evaluar el papel de estas células en la fisiopatología de esta enfermedad y se encontró que los ratones knockaut ($\gamma\delta^{-/-}$) y aquellos en los que se administró anticuerpo monoclonal dirigido contra el TCR $\gamma\delta$, tenían un menor grado de EICH y una mayor SG respecto al grupo control de la misma cepa. Por otro lado a estas células se les ha atribuido múltiples funciones en la respuesta inmunológica, considerándose importante su función como células presentadoras de antígenos en forma independiente del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MCH). También se ha demostrado en algunos estudios que cepas de ratón que carecen de este gen, son susceptibles a múltiples tipos de carcinogénesis, considerándose que estas células tienen un efecto antitumoral.

Sin embargo, se desconoce hasta el momento, el papel que tienen estas células en la evolución de los pacientes con trasplante alogénico de células tallo periféricas, ya que aun no se han estudiado estos linfocitos en los humanos y solo se conocen los resultados obtenidos en los modelos murinos.

Por lo tanto, considerando la importancia que pueden tener estas células en el trasplante alogénico de células tallo periféricas y a su posible participación en la fisiopatología de la enfermedad injerto contra huésped, la finalidad de este estudio fue como primer paso, verificar si los linfocitos T $\gamma\delta$ se movilizaban en los

donadores sanos histocompatibles, de los pacientes candidatos a trasplante alogénico de células tallo periféricas posterior a la administración del G-SCF. Los resultados obtenidos mostraron un aumento en la cifra absoluta de los linfocitos T $\gamma\delta$ durante los días 5 y 6 del periodo de la movilización con una diferencia estadísticamente significativa entre la muestra basal y la muestra de los días 5 y 6 de la movilización con un incremento de 2.5 veces más respecto a la cifra basal.

Se observó también un aumento en la cantidad de células mononucleares en las muestras previas del donador, con respecto a la cifra basal de aprox. 5.2 veces el valor inicial, considerándose por lo tanto que estas células son movilizadas con el G-SCF.

De los resultados obtenidos, es importante mencionar que en este estudio se encontró que los pacientes tenían una cifra basal de linfocitos T $\gamma\delta$ menor en relación a la cifra basal de estas células en el donador, obteniéndose de acuerdo al análisis estadístico un valor significativo.

Es importante considerar sin embargo que a pesar de las diferentes enfermedades hematológicas con que cursaban los pacientes, conservaron cifras basales menores respecto a sus donadores, solo en 2 casos se observaron cifras basales mayores de los linfocitos T $\gamma\delta$; en el paciente No. 7 quien tenía como diagnóstico una AAG y el paciente 9, quien tenía Dx de LNH folicular, en el resto de los pacientes la cifra basal fue menor.

En el caso de la cantidad de linfocitos T $\gamma\delta$ contenida en las bolsas de las cosechas de células tallo periféricas, no hubo diferencia significativa entre la cantidad de linfocitos $\gamma\delta$ de la 1ra. y 2da. Cosecha, como se muestra en la Fig. 5.

Este es el primer estudio que se realiza sobre la movilización de estas células en los donadores de los pacientes con trasplante alogénico de células tallo periféricas, aun cuando la muestra de donadores y pacientes es pequeña, los resultados se muestran prometedores en cuanto la importancia que pueden tener la cantidad de linfocitos T $\gamma\delta$ movilizados en el donador.

Un hallazgo importante fue la menor cantidad de estos linfocitos en los pacientes con respecto al donador, lo cual podría sugerir que hay una correlación entre una menor cantidad y función de estas células y el desarrollo de trastornos malignos, con lo cual hace reconsiderar el punto ya mencionado en otros artículos, de que estas células tienen una función protectora antitumoral.

En este caso, es necesario continuar este estudio y tener una mayor cantidad de pacientes y donadores para confirmar estos resultados. También sería importante establecer en estudios a futuro, el periodo de reconstitución inmunológica de estas células, en los pacientes sometidos a trasplante alogénico de células tallo periféricas, y hacer una correlación clínica entre la cantidad de estos linfocitos con el estado clínico de pacientes, así como su relación con la EICH ó la respuesta injerto contra tumor.

V. CONCLUSIONES.

- 1: El G-CSF si moviliza los linfocitos T $\gamma\delta$ en los días 5 y 6 de dicho periodo, en el donador de células tallo periféricas.
2. Los linfocitos T $\gamma\delta$ se encuentran en condiciones basales, en menor cantidad en los pacientes, que en sus donadores de células tallo periféricas.
3. No hay diferencia significativa entre la cantidad de linfocitos T $\gamma\delta$ obtenidos entre la 1ra. Y 2da. bolsa de cosecha de células tallo periféricas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baron F, Storb R and Little T. Hematopoietic Cell Trasplantation: Five Decades of Progress. Arch Med Res 2003 (34):528-544.
2. Negrin R, Blume Kg, en: Williams Hematology. 2001. Capítulo 18, ED. McGraw Hill. Pp 209
3. Korbiling M and Paolo Anderlini. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? . Blood 2002: 98(10); 2900-2909.
4. Reddy R. Mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells for transplantation. Transfus Sci 2005: 32; 63-72.
5. Liesved S. Mobilization of hematopoietic stem cells. *Blood Rev* 2000; 14: 205–218.
6. Ferrarini M, Ferrero E, Dagna L, et al. Human $\gamma\delta$ T cells: a nonredundant system in the immune-surveillance against cancer. Trends Immunol 2002: 23 (1): 14-18.

7. Born W, Reardon C and O'Brien R. The function of $\gamma\delta$ T cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2006: 18;31–38.
8. Brandes, M, Willimann K and Bernhard M. Professional Antigen-Presentation Function by Human $[\gamma][\delta]$ T Cells *Science* 2005: 309; 264-268.
9. Moser B and Brandes M. $\gamma\delta$ T cells: an alternative type of professional APC. *Trends Immunol* 2006 :20 ; 2-7.
10. Morita, C.T., et al (1995). Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity*, 3, 495–507.
11. Rischer M, Pscherer S, Duwe S, et al. Human $\gamma\delta$ T cells as mediators of chimaeric-receptor redirected anti-tumour immunity. *Br J Haematol* 2004: 126; 583–592.
12. Kunzmann V . Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* 2000: 96; 384–392.

13. Sato K, Kimura S, Segawa H, et al. Cytotoxic effects of $\gamma\delta$ T cells expanded ex vivo by a third generation bisphosphonate for cancer immunotherapy. *Int. J. Cancer* 2005; 116; 94–99.
14. Hess A. Modulation of Graft-versus-Host Disease: Role of Regulatory T Lymphocytes. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12:13-22.
15. Sadelain, M et al. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nature Rev Cancer* 2003; 3; 35-45.
16. Maeda Y, Reddy P, Lowler P, et al. Critical role of host $\gamma\delta$ T cells in experimental acute graft-versus-host disease. *Blood* 2005; 106;749-755.

ANEXO I

UMAE Especialidades "Dr. Antonio Fraga Mouret".

Centro Medico Nacional "La Raza"

HEMATOLOGIA

HOJA DE INFORMACION Y CONSENTIMIENTO DEL DONADOR.

Protocolo No. _____ Nombre del donador _____.

Hospital _____ Investigador _____.

Titulo del proyecto : **Movilización de los linfocitos T $\gamma\delta$ en el donador relacionado de células tallo periféricas.**

Este documento, tiene por objeto, formalizar y hacer constar el consentimiento informado para la atención médica, entre el paciente (DONADOR), familiar ó tutor, ó representante legal y este hospital, por la prestación de servicios de salud encomendados al IMSS, en el cumplimiento a los artículos 22, de la Ley del seguro Social; 6º, 59º y 54º del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de prestaciones y Servicios de Atención Médica; y a los puntos 4.2 y 10.1.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM. 168-SSA 1-1998, del Expediente Clínico, publicada en el Diario Oficial de la federación el día 30 de septiembre de 1999.

El suscrito (Donador de células tallo) _____, con número de seguridad social (ó identificación oficial) _____, en pleno uso de mis facultades y en el ejercicio de mi capacidad legal, **DECLARO** lo siguiente:

1. Expreso mi libre voluntad para ingresar al Hospital de Especialidades del la Unidad Médica de Alta Especialidad del Centro Médico Nacional La Raza, para el efecto de realizar la DONACIÓN ALTRUISTA DE MIS CELULAS HEMATOPOYETICAS DE LA SANGRE PERIFERICA, aceptando con este objeto, cumplir con la Normatividad establecida en la Ley del Seguro Social y sus Reglamentos.
2. Que el Dr. _____, con número de matrícula _____ y cédula profesional _____, del servicio de Hematología, me ha proporcionado la información completa sobre el proceso de la movilización y donación de células tallo periféricas (Hoja 3 del consentimiento), la cual fue realizada en forma amplia, precisa y suficiente, en el lenguaje CLARO Y SENCILLO, haciéndome saber las opciones, posibles riesgos y complicaciones relacionados con el proceso de la movilización, consistentes en: como son reacciones al FEC-G y durante el procedimiento de aféresis de células tallo y colocación de cateter Mahurkar, en caso de requerirse este último.
3. Ante la información proporcionada sobre el procedimiento de la movilización y la donación de células tallo periféricas, mediante el presente, expreso mi CONSENTIMIENTO LIBRE, ESPONTÁNEO Y SIN PRESION alguna, para que se realicen los procedimiento requeridos para la donación de células tallo periféricas en este hospital. ACEPTO Y AUTORIZO se me atiendan las contingencias y emergencias derivadas del procedimiento que pudieran presentarse; teniendo el suscrito en cualquier momento la libertad de REVOCAR ESTE CONSENTIMIENTO y de rehusar el tratamiento y/o de solicitar el alta voluntaria por así convenir a mis intereses, liberándome al tomar esta determinación de cualquier tipo de responsabilidad médico-legal, a las autoridades y personal de la salud de este hospital.

México, D.F., ____ de _____ del 2006.

Nombre y firma del donador _____

Nombre y firma del médico responsable _____

Nombre y firma del testigo 1 _____ testigo2 _____

ANEXO II

HOJA DE INFORMACIÓN

Protocolo No. _____

Hospital: _____.

Nombre del donador _____

Investigador: _____

Título del proyecto: Movilización de los linfocitos T $\gamma\delta$ en el donador relacionado de células tallo periféricas .

El trasplante de células hematopoyéticas es una forma de tratamiento para las enfermedades hematológicas, benignas y malignas. Estas células se pueden extraer de dos sitios principalmente:

a. De la médula ósea y de sangre periférica. En la extracción directa de la médula ósea, las células se obtienen mediante anestesia general en un quirófano y realizando en promedio 300 a 350 punciones de las crestas iliacas a nivel de la región pósterosuperior. El procedimiento tiene una duración de 2 horas, se extraen 1000 a 1200ml de sangre de la médula ósea, los cuales son transfundidos posteriormente al enfermo (receptor). Se requiere internarse en el hospital 3 días (un día antes, otro durante y el último día después del trasplante. En raras ocasiones puede ocurrir osteomielitis (infección del hueso puncionado) y frecuentemente dolor con duración de 1 semana.

En el caso la donación de células tallo de sangre periféricas: normalmente en la sangre periférica, menos del 1% de las células hematopoyéticas (formadoras de sangre), sin embargo, mediante la aplicación de medicamentos como Filgastrim (FEC-G), las células madre de la médula ósea, viajan hacia la sangre periférica y en ese momento se pueden extraer por medio de una máquina de aféresis. El medicamento se aplica 5 a 6 días antes de la extracción de las células tallo. En ocasiones, puede producir cefalea (dolor de cabeza), escalofrios, fiebre ó dolor osteoarticular. Este medicamento no es quimioterapia. Para poder donar células hematopoyéticas al enfermo (receptor), se deben reunir 2 requisitos: 1. Tener sus estudios de banco de sangre (serología para hepatitis, HIV, brucelosis, etc), actualizados (no más de 10 días de haberlos realizado) y 2.- Tener sus venas de los brazos en buenas condiciones, para ello, la enfermera encargada de aféresis, debe revisarlo antes de donar. Generalmente se realizan dos procedimientos son un día de diferencia uno de otro, cada procedimiento tiene una duración de 2.5 horas. Durante los procedimientos de aféresis, puede ocurrir que el calcio de su sangre disminuya

(se utiliza un anticoagulante de citrato que se une a su calcio de la sangre), en tal caso, los síntomas son: adormecimiento y entumecimiento de las extremidades (brazos y piernas), así como hormigueo. Cuando esto sucede, de inmediato se le administra calcio en forma de tabletas, y si las molestias persisten, se aplica calcio en una de sus venas. Este tipo de extracción de células hematopoyéticas, no requiere de hospitalización ni de anestesia. Sus glóbulos blancos (leucocitos), se incrementarán a 15,000 mm³ ó más, sin embargo, 1-2 semanas después, descenderán a niveles normales. He leído y entendido la información contenida en esta hoja y he preguntado al médico mis todas mis dudas acerca de este tipo de donación. Se me han explicado los riesgos y beneficios y ACEPTO REALIZAR LA DONACIÓN ALTRUISTA DE MIS CELULAS HEMATOPOYETICAS DE LA SANGRE PERIFERICA.

Nombre y firma del donador: _____

Testigo 1 _____ Testigo 2 _____

Nombre y firma del médico _____

Lugar y Fecha: _____

