



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**NUEVOS DESAFÍOS DE BIOMARCADORES PARA LA SELECCIÓN DEL
BINOMIO DONADOR-RECEPTOR EN TRASPLANTE DE CÉLULAS
HEMATOPOYÉTICAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JIMÉNEZ VICTORIA JULIAN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL.
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, CD. MX., OCTUBRE, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 20 de junio de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS del alumno JIMÉNEZ VICTORIA JULIAN con número de cuenta 410005640, con la tesis titulada "NUEVOS DESEAFÍOS DE BIOMARCADORES PARA LA SELECCIÓN DEL BINOMIO DONADOR-RECEPTOR EN TRASPLANTE DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS", realizada bajo la dirección de la DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ.

Presidente: DR. EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ
Vocal: DR. DAVID CRUZ ROBLES
Secretario: DRA. MARÍA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL
Suplente: DR. EMILIO JOAQUÍN CÓRDOVA ALARCÓN
Suplente: DRA. SILVIA JIMÉNEZ MORALES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 21 de septiembre de 2016

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos.

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por enriquecer mi formación profesional y la realización de esta tesis

A la beca CONACYT recibida con número de apoyo 385718 y al apoyo otorgado por el Instituto Mexicano del Seguro Social, número de matrícula 99096792.

A los miembros del comité tutor, Dra. María del Carmen Maldonado Bernal y Dr. Carlos Rosales Ledezma, por la guía y los consejos para la realización y culminación de esta tesis.

Agradecimientos Personales.

A mi madre, por su incansable esfuerzo y apoyo, por todo el cariño y amor que me ha mostrado durante estos 25 años de vida, por ser el pilar en dónde se que puedo refugiarme ante cualquier adversidad, por ser una de las partes fundamentales de que este viaje llegara a buen término.

Gracias por todo lo que me has brindado, por todos los consejos, los regaños, las palabras de consuelo y de aliento.

Gracias por ayudarme a levantarme cuando me tropiezo y gracias por festejar a mi lado cada triunfo. Quisiera que me fueras eterna, y ni un millón de palabras podría expresar lo agradecido que estoy de que TU seas mi madre, te amo Teresita!

A mi padre, ya que a pesar de todas las complicaciones que se han presentado en su vida, me ha apoyado en todo momento, teniéndome presente en todas y cada una de sus oraciones.

A mi familia más cercana, mi hermana Lorena, mi tía Lety, mi segunda mamá, mi Mamá Bun y a mi hermanito Manuel, gracias por apoyarme, cada uno a su manera, por creer en mi y motivarme para seguir adelante.

A Cesar Montoro, por todo el apoyo recibido, antes, durante y sobretodo, en la recta final de la maestría, gracias por ayudarme y estar a mi lado en todo momento, los buenos, los malos y los peores, gracias por ser mi cómplice en todas mis locuras y por hacerme parte de tu vida, te amo y recuerda, que todavía le quedan muchas hojas que escribir a nuestra historia.

A todos mis colegas y compañeros de laboratorio, por todo el apoyo recibido para el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Martha Esthela Pérez, por abrirme con gran amabilidad las puertas de su laboratorio, por la gran oportunidad que me brindó al poder desarrollar este proyecto, por todos los consejos, sugerencias y regaños.

A todo mi comité tutorial, por todos los buenos consejos y sugerencias recibidos de su parte, en especial al Dr. Diego Arenas, que aunque sólo tuve la fortuna de tenerlo un semestre como parte del comité siempre se mostró amable y dispuesto a ayudarme en lo que necesitara.

“Tenemos mucho en común, la misma tierra, el mismo aire, el mismo cielo, quizá si empezáramos a mirar lo que tenemos en común en vez de lo que nos hace diferente, bueno quien sabe...”

Meowth.

“It must be a fragile system if it can be brought down by just a few berries”

Katniss Everdeen.

“Las circunstancias en que uno nace no tienen importancia, es lo que uno hace con el don de la vida lo que nos dice quiénes somos”

Mewtwo.

Índice

índice de figuras, tablas y graficas	i
Abreviaturas.	ii
Resumen.	1
Abstract	3
1 Introducción	5
1.1 El trasplante de células hematopoyéticas (TCH) como herramienta terapéutica; un panorama general.	5
1.2 Los inicios del TCH.	6
1.3 La historia del TCH en México.	8
1.4 El protocolo para el TCH.	9
1.4.1 Compatibilidad donador-paciente de sistema ABO y antígenos HLA.	9
1.4.2 Fuente de las células a injertar.....	11
1.4.3 Caracterización de las células a injertar.	12
1.4.4 Esquemas de acondicionamiento.	12
1.4.5 Reconstitución inmunológica.	13
1.5 La célula Natural Killer (NK).	15
1.5.1 El desarrollo y la función de las células NK.	16
1.6 Receptores KIR.	19
1.6.1 La organización de los genes KIR en Haplotipos.	23
1.7 El efecto injerto vs. leucemia.	24
1.8 Infecciones posteriores al trasplante de células hematopoyéticas.	25
1.9 Enfermedad Injerto vs Hospedero (EICH).	25
1.10 La importancia del sexo en el TCH.	26
1.11 Biomarcadores en HSCT.	27
2 Planteamiento del problema.	28
3 Hipótesis.	29
4 Objetivo General.	29
5 Objetivos Particulares.	29
6 Material y métodos.	30
6.1 Receptores de trasplante.	30
6.2 Obtención de material genético.	30
6.3 Cuantificación del DNA.	31
6.4 Genotipificación de genes KIR.	32
6.5 Seguimiento clínico.	33
6.6 Clasificación de los pares donador-receptor.	33
6.7 Análisis estadístico.	34
7 Resultados.	35
7.1 Descripción de la población de estudio.	35
7.2 Frecuencia genes activadores e inhibidores.	36

8	Discusión.....	44
9	Conclusiones.	47
10	Literatura citada.....	48
11	Anexo 1. Carta de consentimiento informado.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRAFICAS

Figura 1. Tiempo de reconstitución inmunológica después del trasplante.....	15
Figura 2. La exocitosis del contenido granular de la célula NK.....	18
Figura 3. Receptor con dominio de muerte.....	18
Figura 5. Secreción de Interferón Gamma	19
Figura 6. El complejo de receptores leucocitarios extendido y el haplotipo KIR.	20
Figura 7. La estructura y la nomenclatura de los genes KIR.	22
Figura 8. Formación de los haplotipos KIR.	24
Tabla 1 Enfermedades neoplásicas y no neoplásicas tratadas con TCH autólogo ó alogénico	5
Tabla 2. Datos demográficos de pacientes pre-trasplante y donadores.....	34
Tabla 3. Resultados de las genotipificación de pacientes y donadores.....	35
Tabla 4. Asociación de datos clínicos con variables genéticas de los receptores KIR.....	37
Tabla 5 Datos demográficos de los pacientes con LMA y LLA	40
Tabla 6. Asociación de datos clínicos con variables genéticas de los receptores KIR pacientes con LMA .	42
Tabla 7. Asociación de datos clínicos con variables genéticas de los receptores KIR pacientes LLA	42
Grafica 1. Frecuencia genes inhibidores KIR.....	36
Gráfico 2. Frecuencia de genes activadores KIR	36
Gráfica 3. Sobrevida de los pacientes de acuerdo a genotipo KIR.....	39
Grafica 4. Sobrevida de pacientes de acuerdo a contenido B.....	39
Grafica 5. Frecuencia genes activadores KIR	41
Grafica 6. Frecuencia genes inhibidores KIR	41

Abreviaturas.

EICH:	Enfermedad injerto contra hospedero.
G-CSF:	Factor estimulador de colonias de granulocitos, del Inglés Granulocyte-Colony Stimulating Factor.
GM-CSF:	Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos, del Inglés Granulocyte and Monocyte-Colony Stimulating Factor.
HLA:	Antígeno leucocitario humano, del Inglés Human Leukocyte Antigen.
IL:	Interleucina
iNK	Célula asesina natural inmadura, del Inglés immature Natural Killer
ITAM:	Motivo activador del inmunoreceptor basado en tirosina, del Inglés Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif.
ITIM:	Motivo inhibidor del inmunoreceptor basado en tirosina, del Inglés Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motif.
KIR:	Receptor tipo inmunoglobulina de la célula NK, del Inglés Killer-Cell Immunoglobulin-like Receptor.
LACOHG:	Grupo Onco-hematológico cooperativo de América Latina, del Inglés, Latin America Cooperative Onco-Hematology Group.
LLA:	Leucemia linfoblástica aguda.
LMA:	Leucemia mieloblástica aguda.
MHC:	Complejo principal de histocompatibilidad, del inglés Major Histocompatibility Complex.
MO:	Médula
NCR:	Receptor de citotoxicidad natural, del Inglés Natural Cytotoxicity Receptor.
NK:	Célula asesina natural, del Inglés Natural Killer.

- NKG2:** Del Inglés, Natural Killer Group 2.
- PCR-SSP:** Reacción en cadena de la polimerasa – primer de secuencia específica, del Inglés, Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction.
- SCU:** Sangre de cordón umbilical.
- SPM:** Sangre periférica movilizada.
- TCH:** Trasplante de células hematopoyéticas.

Resumen.

El trasplante de células hematopoyéticas (TCH) es el principal tratamiento médico para restaurar la hematopoyesis en aquellos pacientes con enfermedades genéticas o después de la aplicación de radioterapia en pacientes con neoplasias hematológicas.¹⁻²

Las células que se utilizan en el trasplante pueden ser obtenidas de médula ósea, cordón umbilical o de sangre periférica movilizada con citocinas recombinantes (G-CSF o GM-CSF) .

El uso de células movilizadas surge en los años 90's y a diferencia de las colectadas de médula ósea no requieren el uso de anestesia para ser extraídas.

Dependiendo del origen del injerto, el TCH puede ser dividido en dos: autólogo cuando las células provienen del mismo paciente y alogénico cuando vienen de un donador sano.

El TCH involucra el tratamiento de los pacientes con quimioterapia y/o radioterapia conocido como esquema de acondicionamiento, con la finalidad de reducir el mayor número de blastos presentes en sangre periférica, así como de abatir la respuesta inmune del receptor para reducir el riesgo de rechazo al injerto. Además, de contar con un espacio físico en la médula ósea para el establecimiento del mismo.^{2,4}

La reconstitución inmune posterior al trasplante es sumamente importante para el desarrollo del efecto injerto vs. leucemia, en donde se busca eliminar por completo las células leucémicas residuales. Por parte del linaje mielóide los neutrófilos y monocitos son los primeros tipos celulares en alcanzar niveles normales en sangre periférica. Del lado del linaje linfóide, a las 2 ó 3 semanas posteriores al trasplante se tienen niveles normales e incluso elevados de células NK, los linfocitos T CD4+ tardan hasta un año en recuperar sus conteos normales, mientras que las células B pueden tardar incluso hasta 2 años.

Las células Natural Killer representan la primer línea de defensa frente a infecciones virales, además de que participan en la enfermedad injerto contra hospedero, la principal complicación después del trasplante, y el efecto injerto contra leucemia.

Una de las familias de receptores más importantes, tanto por su interacción con las moléculas del antígeno leucocitario humano (HLA), como por los polimorfismos que presentan, es la de los receptores KIR, los cuales son codificados por 14 genes funcionales y 2 pseudogenes.

Con base en lo anterior se realizó un estudio de tipo cohorte con 68 parejas donador-paciente, HLA compatibles, sometidas a trasplante de células hematopoyéticas bajo el régimen de acondicionamiento Bu-Cy y a quienes se les dio un seguimiento total de 700 días posteriores al trasplante.

Tanto en donadores como en pacientes se realizó la tipificación de los genes KIR mediante PCR-SSP, encontrando una asociación entre el genotipo KIR (activador o inhibidor) y la presencia de enfermedad injerto contra hospedero (EICH), la incidencia de recaída y la sobrevida en los pacientes.

Se encontró que en específico el genotipo Bx se relaciona a un mayor riesgo de desarrollar EICH, pero también se asocia a un menor riesgo de recaída y mayor sobre vida en aquellos pacientes con donador con puntaje de B=2; del lado contrario se encontró un riesgo aumentado de padecer una recaída en aquellos pacientes cuyo donador posee un puntaje de 1.

Para corroborar estos datos se procedió a dividir a la población de acuerdo a los diagnósticos iniciales, no encontrando ninguna diferencia entre los pacientes con leucemia mieloide aguda y leucemia linfocítica aguda, solamente confirmando la tendencia del genotipo Bx y el contenido de B=2 a mostrar mejores pronósticos médicos.

De esta manera podemos concluir que es importante la realización del estudio de la tipificación de los genes KIR para mejorar los criterios de selección del binomio donador-receptor, así como usar los datos obtenidos de la misma como marcadores que puedan predecir el curso del trasplante.

Abstract

Hematopoietic cell transplantation (HCT) is the main medical treatment to restore hematopoiesis in patients with genetic diseases or after radiotherapy application in patients with hematological malignancies.¹⁻²

The cells used in transplantation may be obtained from bone marrow, umbilical cord blood or peripheral blood mobilized using recombinant cytokines (G-CSF or GM-CSF).

Using mobilized cells arises in the 90's and, unlike the bone marrow, do not require the use of anesthesia for collection.

Depending on the source of the graft, HCT can be divided into autologous, when cells are obtained from the same patient, and allogenic when cells come from a healthy donor.

HTC involves the treatment of patients with chemotherapy and / or radiotherapy, known as scheme conditioning, in order to reduce the largest number of blasts present in peripheral blood, as well as abate the recipient's immune response to reduce the risk of rejection graft. In addition, to have a physical space in the bone marrow for graft establishment.^{2-4.}

Post-transplant immune reconstitution, is extremely important for the development of graft-vs. leukemia effect, in which seeks to completely eliminate residual leukemic cells. In myeloid lineage, monocytes and neutrophils are the first cell types to reach normal levels in peripheral blood, in lymphoid lineage, the patient reach normal levels at 2 or 3 weeks after transplantation.

Natural Killer cells represent the first line of the defense against viral infections, and involved in graft vs. host disease, the main complication after transplantation, and graft-versus-leukemia effect.

KIR genes encode for proteins, which are one of the most important families of natural killer cells receptors, these, interacts with molecules in the human leukocyte antigen (HLA) and have high degree of polymorphism.

Based on previous information, a cohort-type study was performed with 68 pairs donor-patient, HLA compatible, undergoing hematopoietic cell transplantation, under the Bu-Cy conditioning regimen and who were given a total follow-up of 700 days after the transplant.

Donors and patients KIR genotyping was performed by PCR-SSP, it was found an association between KIR genotype (activator or inhibitor) and the presence of graft vs. host disease (GVHD), the incidence of relapse and survival in patients.

It was found that specific genotype Bx, is related to a higher risk of developing GVHD, but also associated with a lower risk of relapse and high survival rate in patients with have donor with B score = 2, the opposite side, an increased risk of relapse in patients whose donor has a score of 1 was found.

To corroborate these data we proceeded to divide the population according to the initial diagnosis, finding no difference between patients with acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia, only confirming the trend of genotype Bx and content of B = 2 to show better medical prognoses.

Thus we can conclude that KIR genotyping is important to improve the donor selection criteria, also we can use this data as markers that can predict the course of transplantation.

1 Introducción

1.1 *El trasplante de células hematopoyéticas (TCH) como herramienta terapéutica; un panorama general.*

El TCH, conocido en un inicio como trasplante de médula ósea, representa uno de los principales tratamientos médicos para aquellos pacientes que padecen alguna enfermedad hematológica, también es utilizado para combatir algunos tipos de cáncer y otros padecimientos inmunológicos (Tabla1), tiene dos objetivos claros, el primero es sustituir la hematopoyésis del paciente al estar total o parcialmente defectuosa, insuficiente o con características neoplásicas. El segundo objetivo es permitir un tratamiento agresivo con dosis de quimioterapia y de radioterapia elevadas que originan una mielosupresión prolongada o definitiva^{1,2}.

Además, en el TCH a partir de un donador sano, las células inmunocompetentes derivadas del injerto tienen la capacidad de generar una respuesta inmunológica contra las células neoplásicas residuales, dicho fundamento se conoce como enfermedad injerto vs. leucemia.

Los trasplantes, en general, se pueden clasificar de acuerdo al origen del injerto en autólogo, cuando el injerto proviene del mismo sujeto, alogénico o heterólogo cuando proviene de un donador sano y finalmente singénico cuando proviene de un hermano gemelo idéntico.^{1,3}

El trasplante autólogo se utiliza en el tratamiento de algunas leucemias, linfomas y algunos otros tipos de cáncer como el testicular y el neuroblastoma (Tabla 1). Una de las ventajas de la realización de un trasplante autólogo es la nula incidencia de rechazo hacia el injerto, además de que no existe riesgo de desarrollar enfermedad injerto contra hospedero (EICH).^{1,3}

Sin embargo, este procedimiento tiene algunas desventajas, ya que al momento de la colecta de las células también se pueden tomar algunas células cancerosas que al injertarse vuelven a desarrollar la enfermedad. Además de esto, el paciente genera la misma respuesta inmune que poseía anteriormente, haciendo que las células residuales cancerosas puedan volver a recapitular la enfermedad.^{1,3}

El trasplante alogénico, se utiliza para el tratamiento de una mayor cantidad de enfermedades hematológicas (Tabla 1) y a diferencia del autólogo, presenta la complicación de desarrollar posible rechazo hacia el injerto por parte del receptor, ya que es de vital importancia la compatibilidad de los antígenos principales de histocompatibilidad (MHC). Sin embargo, el riesgo de recaída es menor cuando se realiza este tipo de trasplante, pues si bien la EICH representa una causa importante de mortalidad después del trasplante, también tiene un efecto benéfico, pues se asegura la eliminación de las células leucémicas residuales.^{4,5}

Finalmente el trasplante singénico se elimina el riesgo de un rechazo del injerto o de la aparición de la EICH al tratarse de células injertadas con el mismo perfil de MHC, además a diferencia del trasplante alogénico, no existe el riesgo de presencia de células cancerosas.^{1,3}

Tabla 1 Enfermedades neoplásicas y no neoplásicas tratadas con TCH autólogo ó alogénico		
	Trasplante Autólogo	Trasplante Alogénico
Neoplasias	Mieloma Múltiple Linfoma No-Hodgkin Leucemia Mieloide Aguda Neuroblastoma Cáncer de Ovario	Leucemia Mieloide Aguda Leucemia Linfoblástica Aguda Leucemia Mieloide Crónica Síndrome Mielodisplásico Mieloma Múltiple Neoplasias Mieloproliferativas Leucemia Mieloide Crónica Juvenil
Desórdenes no neoplásicos.	Enfermedad Autoinmune Amiloidosis	Anemia Aplásica Anemia de Fanconi Anemia de Células Falciformes Inmunodeficiencia Severa Combinada Talasemia Mayor Síndrome de Wiskott-Aldrich

En esta tabla se observa la clasificación de los trasplante de acuerdo a la fuente de obtención de las células hematopoyéticas y los tipos de enfermedades en los que se utiliza este procedimiento.

1.2 Los inicios del TCH.

Existen reportes de que los primeros injertos de células, con la finalidad de tratar padecimientos como anemias y leucemias, consistían de extractos de médula ósea o de bazo, los cuales se administraban inyectados o por vía oral en la década de los 50.⁶

En el año de 1957 se reporta el primer injerto de células provenientes de médula ósea en un paciente que había recibido radiación y quimioterapia, debido a los resultados positivos en la restauración de la hematopoyésis ,se

siguieron realizando estos procedimientos para el tratamiento, principalmente, de distintos tipos de leucemia, aunque el número de casos exitosos era bajo.^{6,7}

A principios de los años 60 empezó a tomar mucha importancia la participación de los antígenos de histocompatibilidad (HLA) en el trasplante, pues se observó que eran un factor clave para el desarrollo de la EICH o de rechazos hacia los injertos, 10 años después comenzó a darse mayor énfasis al cuidado de los pacientes, antes y después de realizado el trasplante, estas mejoras tuvieron un impacto positivo en la sobrevivencia de los pacientes, observándose hasta un 70% más de casos exitosos.^{6,8}

El accidente nuclear ocurrido en Chernobyl en 1986 por la elevada exposición a la radiación, provocó, entre otras cosas, la supresión en la hematopoyesis de miles de personas, las cuales fueron tratadas con TCH. Durante la década de los 80s aumentó el interés por mejorar las condiciones del trasplante, por lo que se hizo énfasis en los criterios de selección de los pacientes como factores de riesgo, el estado de la enfermedad, el tipo de trasplante, infecciones, entre otras cosas.⁹

También durante estos años se desarrolló la tecnología de la crio-preservación, por lo que el uso de las células de médula ósea autólogas, aumentó para el tratamiento de padecimientos hematopoyéticos y de tumores sólidos además, se logró un avance muy importante en este campo, pues se descubrió que tras la administración de factores estimulantes de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), existía una cantidad considerable de células progenitoras y precursoras en sangre periférica.⁹

En 1986 se desarrolló en Estados Unidos, un programa de registro que buscaba e identificaba donadores compatibles no relacionados a aquellos pacientes que no contaban con un donador en su familia. Actualmente dicho registro se conoce como Programa Nacional de Donadores de Médula Ósea.⁹

Durante los años 90s se amplió el uso de trasplante alogénicos, esto gracias al mejoramiento de las técnicas de tipificación de HLA, además comenzó la aplicación de tratamientos con bajas dosis de quimioterapia y radioterapia, lo cual se conoce como esquema de acondicionamiento no mieloablativo, esto impacta de manera positiva en la sobrevivencia del paciente al reducir la toxicidad de dicho tratamiento. Junto con esto se inició el interés por la obtención de células hematopoyéticas de sitios diferentes a la médula ósea, una de las mejores alternativas resultó ser la sangre de cordón umbilical (SCU), pues se obtuvieron células troncales en mayor concentración y con menor capacidad para desarrollar rechazos.⁹

En la actualidad los esfuerzos se enfocan en la prevención y el tratamiento de la EICH, que representa la mayor complicación del TCH. Para esto existen guías publicadas por distintas asociaciones como: la Sociedad Americana de Trasplantes de Médula Ósea y los Institutos Nacionales de Salud, que tienen como finalidad orientar a los médicos sobre el "momento ideal" para aplicar un tratamiento contra la EICH.⁹

1.3 La historia del TCH en México.

En México, el primer TCH se realizó en el año de 1980, dentro de las instalaciones del Instituto Nacional de la Nutrición “Salvador Zubirán” (INNSZ). Posteriormente se llevaron a cabo algunos procedimientos más pero dado a los pobres resultados obtenidos el TCH fue retomado como práctica clínica hasta 1995, año en el cual se comenzaron a utilizar células movilizadas a sangre periférica.¹⁰

Posterior a la creación del programa de trasplante en el INNSZ, surgieron en el país distintos centros que iniciaron sus propios programas. Los primeros trasplante autólogos y alogénicos con la implementación de sangre periférica movilizada, fueron realizados en el Instituto Nacional de Cancerología en 1992 y 1996, respectivamente; mientras que los primeros trasplantes utilizando SCU se llevaron a cabo en el Hospital Gabriel Mancera del IMSS, en 1998, durante ese mismo año en el Hospital Universitario de Monterrey se realizó el primer trasplante utilizando un esquema de acondicionamiento no mieloablativo.^{10,11}

Un año después, se llevó a cabo la primera y única reunión de los diferentes grupos de trabajo de TCH en el país, en donde se discutieron los avances y nuevos desafíos que se planteaban para el TCH. Hasta esa fecha se habían realizado un total de 649 trasplantes, de los cuales el 61.6% eran de tipo alogénico, mientras que el resto era autólogo.¹¹

Los centros con mayor número de trasplantes realizados hasta 1999 eran el Centro Médico La Raza (8.6%), Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS (7.5%), Hospital de Especialidades del IMSS en Puebla (7.7%), INNSZ (5.1%), Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla (5.1%), Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE (3.4%), Hospital Universitario de Monterrey (2.5), Instituto Nacional de Pediatría (2.0%) y Hospital Infantil de México (0.8%).^{7,11}

Actualmente, la Ciudad de México, Puebla y Monterrey, son las principales entidades federativas en donde se realizan TCH de tipo alogénicos, la mayoría utilizando esquemas de acondicionamiento mieloablativo, es decir con dosis de quimioterapia y radioterapia elevadas. Sin embargo, en últimos años se ha dado un mayor impulso a la utilización de esquemas no mieloablativos, también conocidos como de intensidad reducida, debido a que benefician la sobrevida del paciente y disminuyen los costos hospitalarios para las instituciones de salud.^{11,12}

Nuestro país cuenta con una versión “modificada” del esquema no mieloablativo tradicional, conocido como *Esquema Mexicano*, el cual consiste en la aplicación conjunta de fludarabina, ciclofosfamida y busulfán. Dicho esquema ha demostrado efectividad en el trasplante alogénico y además se ha adoptado como esquema de referencia para el grupo LACOHG (Latin America Cooperative Onco-Hematology Group), empleándose en países como Venezuela, Brasil y Colombia.^{13,14.}

1.4 El protocolo para el TCH.

Una vez que el paciente es inscrito al protocolo de trasplante, se lleva a cabo una exhaustiva revisión y seguimiento médico, el cual consiste en la aprobación del estado de salud del sujeto por los distintos especialistas. Además, se le realizan pruebas de gabinete y laboratorio antes de que se realice el trasplante, dentro de las pruebas de laboratorio más importantes, se encuentran: la prueba de histocompatibilidad HLA y la compatibilidad de grupo sanguíneo ABO entre donador y paciente.¹⁵

Otro aspecto importante que se considera antes de realizar el trasplante es el origen y la caracterización de las células a injertar, a la fecha se tienen tres fuentes de obtención, médula ósea (MO), sangre periférica movilizada (SPM) y SCU, cada una de éstas con diferente potencial de injerto.¹⁶

Finalmente en el periodo pre-trasplante (antes del trasplante), se debe también de seleccionar el esquema de acondicionamiento más adecuado para el paciente, pues esto impacta en la sobrevida de los mismos. Se cuenta con dos tipos de esquema de acondicionamiento, clasificados de acuerdo al nivel o dosis de radiación y quimioterapia recibidos, los esquemas mioablativos se recomiendan para pacientes jóvenes, mientras que los esquemas no mioablativos se utilizan en pacientes de la tercera edad y pacientes pediátricos.¹⁷

Durante los días y meses después del trasplante, conocidos como periodo post-trasplante, se realiza en el paciente un seguimiento médico para verificar la reconstitución inmunológica, a través del conteo de neutrófilos en sangre periférica, además se brinda atención a los signos que pueden indicar la aparición de la EICH o del rechazo al injerto.¹⁸

Con la finalidad de evitar las recaídas, los médicos realizan en el injerto una eliminación de células tumorales, para disminuir la probabilidad y el riesgo de infundir células cancerosas. Sin embargo este procedimiento también daña la viabilidad de las células progenitoras, generando tiempos más prolongados de reconstitución y aumentando el riesgo de padecer enfermedades infecciosas.¹⁸

Todos los puntos indicados en los periodos pre y post-trasplante se verán más a detalle a continuación.

1.4.1 Compatibilidad donador-paciente de sistema ABO y antígenos HLA.

A diferencia de las transfusiones sanguíneas y los trasplantes de órganos sólidos, casi una tercera parte de los TCH se realizan dejando atrás la compatibilidad de grupo sanguíneo ABO, sin embargo; existen estudios en donde afirman que si bien la incompatibilidad de grupo sanguíneo no significa una contraindicación al trasplante, si aumenta el riesgo de reacciones negativas en el paciente que pueden, en algún momento comprometer su vida.^{8,15}

Las incompatibilidades de grupos ABO se dividen en dos:

- 1) La incompatibilidad menor, es aquella en donde los linfocitos B del donador producen anticuerpos contra los antígenos presentes en los glóbulos rojos del receptor, por ejemplo donador con tipo O y un receptor de tipo A o B.
- 2) La incompatibilidad mayor, se presenta cuando existe la presencia de anticuerpos contra los antígenos del eritrocito del donador, por ejemplo un receptor tipo O y un donador A o B.^{19,20}

Es bien sabido que la incompatibilidad de grupo ABO incrementa el riesgo de hemólisis en cualquiera de los grupos; sin embargo, no existe la suficiente evidencia de que ésta tenga un impacto relevante en la recuperación del paciente.¹⁵

Por otro lado, el desarrollo de los estudios de histocompatibilidad inició con el descubrimiento de los antígenos HLA por Jean Dausset, quien observó que sueros de pacientes politransfundidos aglutinaban glóbulos blancos.²¹

La compatibilidad de tejidos está determinada por los genes que codifican para el MHC, conocido en el humano como HLA. Dichos genes se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 y tienen como función biológica iniciar la respuesta inmunológica frente a péptidos extraños, permitiendo el reconocimiento de lo propio y de lo ajeno.^{21,22.}

Las proteínas codificadas por dichos genes se clasifican en dos clases: la clase I la componen los loci HLA-A, -B y -C y son expresadas en todas las células del cuerpo que poseen núcleo, mientras que la clase II está formada por HLA-DR, -DQ y -DP y se encuentran expresadas sólo en células presentadoras de antígeno profesionales, como lo son las células dendríticas, los linfocitos B y los macrófagos.²²⁻²³

Esta familia de genes es la más polimórfica en el genoma humano, pues hasta la fecha se tienen reportados más de 2500 alelos en las diferentes poblaciones estudiadas. La presencia del polimorfismo inicialmente se identificaba de manera serológica, sin embargo a la fecha la tipificación de estos genes se realiza a nivel molecular utilizando como base el DNA para detectar distintos tipos de alelos de un mismo antígeno, teniendo así una mayor definición del sistema.²³

Las técnicas moleculares usadas hoy en día varían en la resolución de la tipificación. De esta forma se denomina baja resolución cuando se identifican un grupo de familias o alelos clasificados en serotipos, teniendo una notación en dos dígitos por ejemplo HLA-A2. La mediana resolución permite discriminar alelos individuales con su respectivo serotipo (HLA-A*0201), este nivel de resolución es generalmente usado para la selección de donadores pues se asegura que se comparta el alelo.²³

Por lo anterior, el mejor donador es aquel que es genotípicamente HLA compatible con su receptor, los estudios de compatibilidad generalmente se

hacen en familia con el objetivo de buscar un donador, además tiene la finalidad de confirmar el genotipo del receptor para la búsqueda de genotipos en donadores no relacionados si fuera necesario.²³

Inicialmente los estudios de compatibilidad se enfocaban a los loci A,B y DRB1, posteriormente se observó la importancia de tipificar al loci HLA-C, pues se descubrió que algunas diferencias alélicas en este loci son mejor o peor toleradas que otras durante el trasplante, impactando en una menor o mayor frecuencia de rechazos.²⁴

Dentro del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, se llevan a cabo los estudios de histocompatibilidad a mediana resolución para los loci HLA-A,-B,-C,-DR, -DQ, resultando donadores HLA-compatibles si comparten los dos haplotipos (grupos de genes HLA heredados en bloque), (10/10 antígenos) o haploidénticos cuando solo comparten un haplotipo (5/10 antígenos) a nivel de grupo de alelos.¹¹

La importancia de estos estudios radica en EICH, en donde las células inmunes del donador atacan a las células sanas del receptor provocando daños en diversos órganos, existe evidencia que entre mayores diferencias o discrepancias en los genes HLA entre donador y paciente existan, aumenta el riesgo de desarrollo de reacciones adversas.²⁵

1.4.2 Fuente de las células a injertar.

Como ya se mencionó, existen tres fuentes de obtención de células hematopoyéticas, MO, SCU y SPM. La MO fue la primer fuente utilizada para obtener células hematopoyéticas, realizando trasplante de tipo aogénico con un éxito moderado, ya que la incidencia de EICH en los pacientes era de más del 80% de los casos, lo que se traducía como una mayor mortalidad.¹⁶

Además de los aspectos negativos en los pacientes, la obtención de las células resultaba en un procedimiento riesgoso y doloroso para los donadores, pues se tiene que aspirar directamente de huesos largos y planos como el esternón o las crestas iliacas.¹⁶

Con el descubrimiento de que la aplicación sistémica de factores de crecimiento como el GM-CSF provocaba la migración desde la médula ósea hacia la sangre periférica de precursores y progenitores hematopoyéticos, comenzó el uso de SPM como fuente de dichas células, pues podían ser colectadas fácilmente mediante un proceso de aferésis.¹⁶

El uso de esta fuente no demostraba diferencias entre los índices de éxito de los trasplantes comparados con el uso de células de MO, por lo que desde hace aproximadamente 20 años su uso ha aumentado debido a que el procedimiento no resulta riesgoso para los donadores.¹⁶

Finalmente en los últimos 10 años se ha utilizado la SCU como fuente alternativa para la obtención de células hematopoyéticas, utilizándose principalmente para pacientes pediátricos, los cuales necesitan una dosis más pequeñas de células. Entre las ventajas que presenta el uso de células

obtenidas de SCU es el bajo índice de EICH que presentan los pacientes, pues estas células no son inmunogénicas y tienen un mayor índice de replicación que las obtenidas de SPM y MO.²⁶

Como se menciona anteriormente, cada una de las fuentes de obtención de células hematopoyéticas presentan características diferentes entre sí, pues tanto en el uso de MO como de SPM, la principal complicación es la EICH, que ocurre aproximadamente en el 70% de los pacientes, mientras que con respecto al uso de células de SCU, el principal problema es la baja cantidad de células troncales que se recolectan.²⁷

1.4.3 Caracterización de las células a injertar.

La caracterización del marcador CD34+ como indicador de troncalidad se remonta al uso de anticuerpos monoclonales por Civin *et al.* en 1984, encontrando este marcador en un 1-3% de las células mononucleares de la médula ósea y en una fracción mucho menor en sangre periférica.²⁸ Cultivos de las células CD34+, son capaces de generar unidades formadoras de brotes eritroides, unidades formadoras de colonias granulocito-macrófago, unidades formadoras de colonias de megacariocitos y unidades multipotenciales de colonias granulocito-eritrocito-macrófago-megacariocito.^{29,30}

Mediante el uso de otros marcadores se ha refinado la selección de la población troncal, con capacidad de auto-renovación y diferenciación hacia los distintos linajes hematopoyéticos y caracterizando su inmunofenotipo como CD34+, Thy1+, CD38-, HLA-DR- y marcadores de linajes negativo.²⁹

Una vez extraídas y caracterizadas mediante su marcador de superficie CD34+, las células son cultivadas y congeladas para dar inicio a la quimioterapia con altas dosis de fármacos y de radiación. Ya que el paciente tiene abatida la hematopoyésis, las células son infundidas nuevamente para regenerar las células sanguíneas y de la respuesta inmune. La cantidad ideal de células infundidas para que la hematopoyésis del paciente se recupere de manera rápida y sostenida, es de 400 a 600 millones de células CD34+ por kilogramo de peso del paciente.³¹

1.4.4 Esquemas de acondicionamiento.

Se define como esquema de acondicionamiento a la aplicación, en pacientes que son candidatos a un trasplante alogénico de células hematopoyéticas, de quimioterapia y/o radioterapia, con dos finalidades; la primera de ellas es reducir el número de células malignas (leucémicas) y la segunda es suprimir la respuesta del sistema inmune del receptor para favorecer el injerto de las células troncales.¹⁷

La intensidad de la quimioterapia y la radioterapia puede variar de manera significativa. De manera tradicional, los pacientes más jóvenes con diagnóstico de leucemia, reciben una dosis de ciclofosfamida de 120mg/Kg y radiación total. En otro esquema similar, se realiza la aplicación de ciclofosfamida a la

misma dosis y de busulfán a una dosis de 16mg/Kg; éste último esquema se conoce como Bu-CY. A este tipo de esquemas se les denomina mieloablativos, pues resultan en un abatamiento casi total de la hematopoyésis en el paciente.^{17,32}

En los últimos 35 años, los diversos grupos de trabajo en los centro en donde se realizan trasplantes, han modificado las dosis de quimioterapia y radioterapia según el tipo de paciente; sin embargo, los estudios hasta la fecha, no evidencian que dosis altas, en el esquema de acondicionamiento, aumenten la sobrevida de los pacientes trasplantados.³³⁻³⁵

Desde hace 20 años empezaron a utilizarse otros quimioterapéuticos como la fludarabina y dosis aún menores de radiación total así como agentes alquilantes. Estos regímenes, conocidos como esquemas de intensidad reducida, fueron diseñados para pacientes cuya condición física, previo al trasplante, no permitía el uso de las dosis clásicas. Dichos pacientes generalmente superaban los 50 años de edad; estos esquemas comenzaron a volverse populares a partir del 2001, año en el que este tipo de régimen de acondicionamiento se ocupaba en el 30% del total de casos de trasplante.³³⁻³⁵

Existe un tercer tipo de esquema de acondicionamiento, denominado no mieloablativo, en el cual no se utiliza fludarabina y/o dosis baja de quimio-radioterapia, también son conocidos como mini-trasplante.^{4,36,37}

La toxicidad que desarrollan los pacientes después de someterse a estos esquemas, es proporcional a la dosis, es decir, los tratamientos mieloablativos están relacionados con una mayor toxicidad, menor sobrevida y la aparición de la EICH en los primeros 100 días después del trasplante, lo que se conoce como la EICH de tipo agudo.³⁸

A causa de lo anterior y de haber demostrado una eficacia similar, el uso del esquema no mieloablativo se ha expandido en las instituciones de salud. Además de una menor toxicidad y una mayor sobrevida, el tratamiento no mieloalbativo está relacionado con un requerimiento menor de transfusiones sanguíneas y un menor periodo de neutropenia y por lo tanto la disminución en el índice de infecciones oportunistas.³⁸⁻⁴⁰

Con lo anterior, el paciente se ve clínicamente beneficiado y las instituciones en donde se realiza el trasplante pueden disminuir sus costos, pues a diferencia del esquema mieloablativo donde la hospitalización duraba un mínimo de 4 semanas, en el tratamiento de intensidad reducida la hospitalización se ve disminuida hasta en 1 semana, así como también el consumo de insumos hospitalarios y recurso biológicos (sangre).⁴¹

1.4.5 Reconstitución inmunológica.

La reconstitución inmunológica posterior al trasplante, es una de las limitantes en la eficacia de dicho procedimiento y ocurre a distintos tiempos. Los primeros 100 días posteriores al trasplante se caracterizan por una deficiencia en células linfoides, como las células NK, células T y B, y células mieloides como los

neutrófilos y macrófagos, esto provoca que los pacientes sean susceptibles a infecciones virales, fúngicas y bacterianas.⁴²

La reconstitución post-trasplante se ha estudiado en diversos tipos celulares, siendo los principales los monocitos/macrófagos, las células dendríticas y las células Natural Killer (NK), que forman parte de la respuesta inmune innata. De los monocitos/macrófagos, se tienen cuentas normales después de las primeras dos semanas de la infusión del injerto, aunque estas células carecen de actividad completa.⁴²

Los días posteriores al régimen de acondicionamiento, se conocen como fase aplásica o de neutropenia, que se caracterizan por presentar niveles bajos de neutrófilos en sangre, dicho periodo dura alrededor de 14 días cuando el injerto proviene de SPM (Figura 1), 21 días cuando se utiliza MO y 30 días cuando la fuente es SCU.^{42,43}

Dentro del linaje linfoide, la célula NK es el primer tipo celular en recuperar niveles normales en el paciente (Figura 1), los primeros conteos de células inmaduras NK (iNK) que se caracterizan por el fenotipo KIR-, NKG2-, se registran en el primer mes post-trasplante, mientras que el fenotipo maduro, KIR+ NKG2+, registra niveles normales a partir del segundo mes. Cabe destacar que el desarrollo de este tipo celular es independiente de factores del paciente, por ejemplo la edad, lo anterior ocurre gracias a la rápida expansión de la población de células NK denominada CD56^{bright}, la cual expresa en gran cantidad dicho marcador de membrana y que es además, productora de IL-2, una citocina necesaria para la proliferación celular; esta expansión no se mantiene más allá del primer año después del trasplante.^{18,42.}

Con respecto a la recuperación de los linfocitos T, las células CD8+ son las primeras en reconstituirse (Figura 1), esto debido a la expansión de células T de memoria gracias a la presencia de citocinas y antígenos aloreactivos. La formación de células T naive, o células T “inocentes” está en función de la edad del receptor, pues el timo, el órgano donde las células maduran, tiene un proceso de degeneración conforme avanza la edad del sujeto, por lo que pierde su capacidad para madurar células T.⁴⁴

Finalmente las células B representan el último compartimento de inmunidad celular en ser reconstituido (Figura 1), pues puede tomar hasta dos años para que los niveles en sangre periférica sean normales.⁴⁴

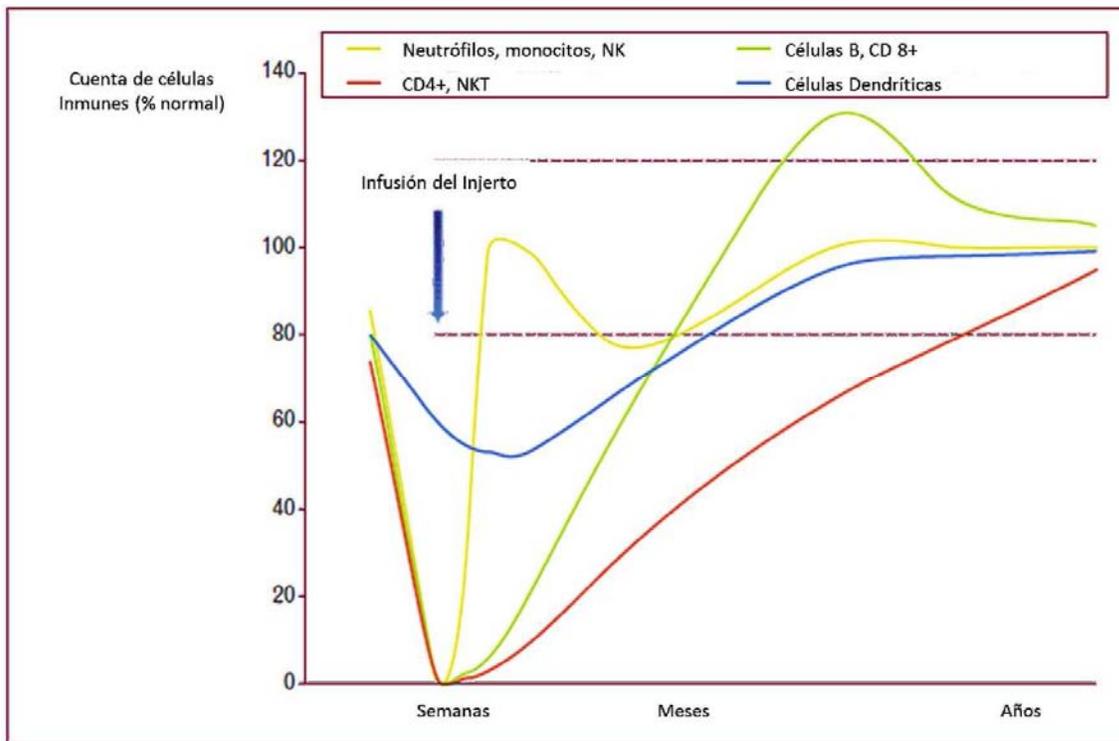


Figura 1. Tiempo de reconstitución inmunológica después del trasplante

Se observa que después de la infusión del injerto casi todos los tipos celulares se ven disminuidos. Los primeros tipos celulares en recuperar los niveles normales en cuestión de las dos primeras semanas son los neutrófilos, monocitos y células NK, mientras que las células T, células dendríticas y células B son las últimas en alcanzar números normales en los pacientes. Modificado de ⁴².

Con la finalidad de reducir las muertes por EICH, se ha desarrollado una estrategia para eliminar a las células T que pueden encontrarse en el injerto, dicho proceso se conoce como depleción de linfocitos T, y aunque disminuye los efectos adversos de la EICH, también provoca un periodo más prolongado de tiempo en el que el paciente es susceptible a contraer infecciones.⁴⁴

Dejando de lado a los linfocitos T y B, las células NK tienen una participación de vital importancia durante la etapa de neutropenia, pues son las encargadas del control de cualquier enfermedad infecciosa que el paciente pudiera llegar a contraer.⁴⁵

1.5 La célula Natural Killer (NK).

Inicialmente, las células NK fueron descritas como una población de linfocitos que son capaces de eliminar células tumorales singénicas sin una inmunización

previa. Actualmente, se ha identificado que su desarrollo proviene de precursores en la médula ósea y que posterior a su maduración y diferenciación ejercen distintas funciones en diversos órganos y tejidos.^{43,45}

En los humanos, las células NK, se caracterizan por los marcadores de membrana CD56+ CD3-, y por la expresión intracelular de perforina, la cual es esencial para el desarrollo de la citotoxicidad. En sangre periférica, las células NK representan la mayor población de linfocitos, constituyendo entre 5-15%.⁴⁶

1.5.1 El desarrollo y la función de las células NK.

El desarrollo de las células NK y así como los otros tipos celulares presentes en la sangre se desarrollan a partir de células troncales hematopoyéticas que residen en la MO, dichas células poseen la capacidad de auto-renovación y de diferenciación, permitiendo así la generación de una población de precursores y progenitores que dan soporte a la hematopoyesis de un individuo.

Durante el desarrollo y la diferenciación de las células NK, se ha identificado que es necesaria la presencia de IL-2 y de IL-15 de manera específica, para desarrollar progenitores de células NK. Para que ocurra su maduración es importante la presencia en membrana de la proteína CD161c, el cual es un receptor de tipo lectina C, de NKp46 que se conoce como receptor de citotoxicidad natural y de CXCR4, el receptor de CXCL12 que participa de manera importante en la retención de progenitores inmaduros en el nicho hematopoyético.^{47,48.}

La diferenciación de célula iNK a madura requiere la aparición de múltiples receptores de membrana funcionales como CD94/NKG2A/C/E y KIR entre otros. Las células NK maduras migran de la médula ósea hacia distintos tejidos y se acumulan principalmente en el bazo, los pulmones y los nódulos linfáticos.⁴⁸

La activación de las células NK está bajo el control de una gran cantidad de receptores presentes en la membrana, generando así una cascada de señalización a través de dominios de activación basados en tirosina (ITAM), provocando la exocitosis de la perforina, así como la expresión de citocinas pro-inflamatorias como el IFN- γ y el TNF.⁴⁹

Debido a que la actividad citotóxica de estas células depende de la señalización de diversos receptores, se ha encontrado que algunos cambios genéticos como mutaciones de un solo nucleótido (SNP), genera alteraciones en la respuesta celular, por ejemplo un polimorfismo de tipo SNP (rs235330), en los genes *ITGB2* y *FCGR3A* genera un citotoxicidad dependiente de anticuerpo menor, en comparación con células que no presentan dicho polimorfismo.⁵⁰

Además de este tipo de variables genéticas, existen otras como la variación en el número de copias del gen, que provoca cambios en la respuesta citotóxica haciendo más o menos capaz a la célula de eliminar a otras infectadas con virus como el del papiloma humano o el virus de la inmunodeficiencia humana.

^{50,51}La citotoxicidad de las células NK está regulada por la señalización que reciben sus receptores de membrana, los cuales son clasificados de acuerdo a su función como activadores e inhibidores. Estos receptores también son clasificados en familias, las dos más importantes son los conocidos como receptores de la célula NK de tipo inmunoglobulina (KIR) y las de tipo lectina C llamados NKG2.⁵²⁻⁵⁶

De esta manera, la activación de la célula NK se da después de la unión del ligando con el receptor activador que permite la fosforilación de las regiones ITAM, esto genera el reclutamiento de otras proteínas como ZAP70 y Syk que inician una cascada de señalización que permite el flujo de calcio al interior de la célula NK, provocando la degranulación y mediante el factor de transcripción NF- κ B la subsecuente producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF e IFN- γ .^{55,56}

Por el lado contrario, la unión de los ligandos y los receptores de tipo inhibidor provocan el reclutamiento de fosfatasa (SHIP1 y SHIP2) las cuales van a defosforilar a las proteínas dentro de la cascada de señalización de activación, es decir van a impedir que se generen los flujos de calcio y la producción de citocinas pro-inflamatorias.^{55,57}

La actividad citotóxica de las células NK posterior a su activación, se puede llevar a cabo de tres maneras, la primera de ellas involucra la degranulación del contenido intracelular (granzimas y perforinas), las cuales van a actuar directamente sobre la superficie de células blanco o diana, generando poros en la misma y activando la vía de apoptosis, desencadenando al final, la muerte celular. (Figura 2)⁵⁸

El siguiente mecanismo involucra el contacto directo de célula – célula para llevar a cabo la citotoxicidad, la célula NK expresa ligandos como TRAIL y FASL , que cuando entran en contacto con su receptor (TRAILR y FAS) provocan la activación de la vía de las caspasas en la célula blanco, ya que estos últimos poseen dominios de muerte. (Figura 3).⁵⁸

Finalmente el último mecanismo de citotoxicidad es la secreción de IFN- γ , que provoca que las células tumorales o infectadas por algún virus sobre expresen moléculas de MHC de clase I, las cuales facilitan el reconocimiento de otros tipos de células inmunes, favoreciendo la fagocitosis de las células tumorales (Figura 4).⁵⁸

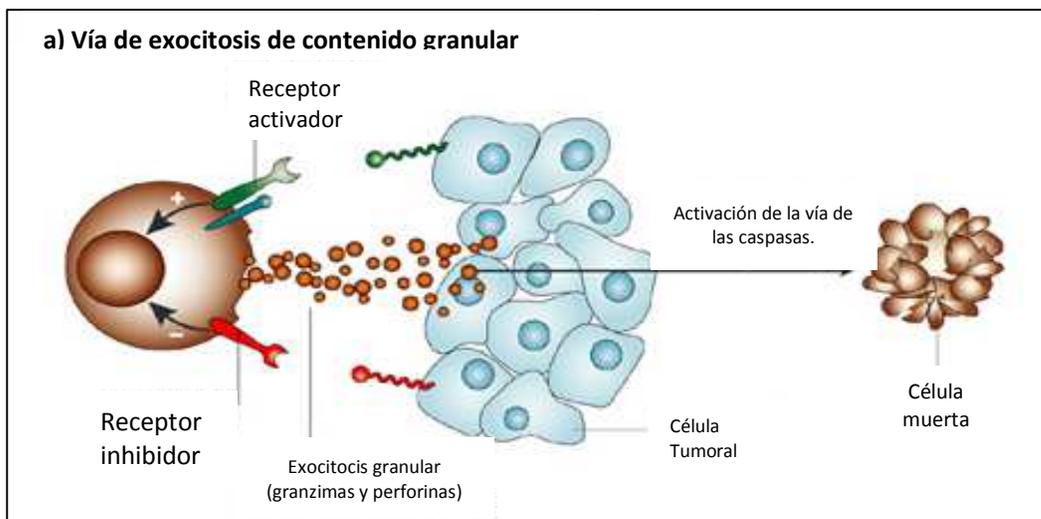


Figura 2. La exocitosis del contenido granular de la célula NK

Se observa que tras la señalización del receptor de tipo activador, se lleva a cabo la liberación del contenido granular, lo cual genera en las células blanco (tumorales) la activación de la vía de las caspasas, que finalmente provoca la muerte de la célula.

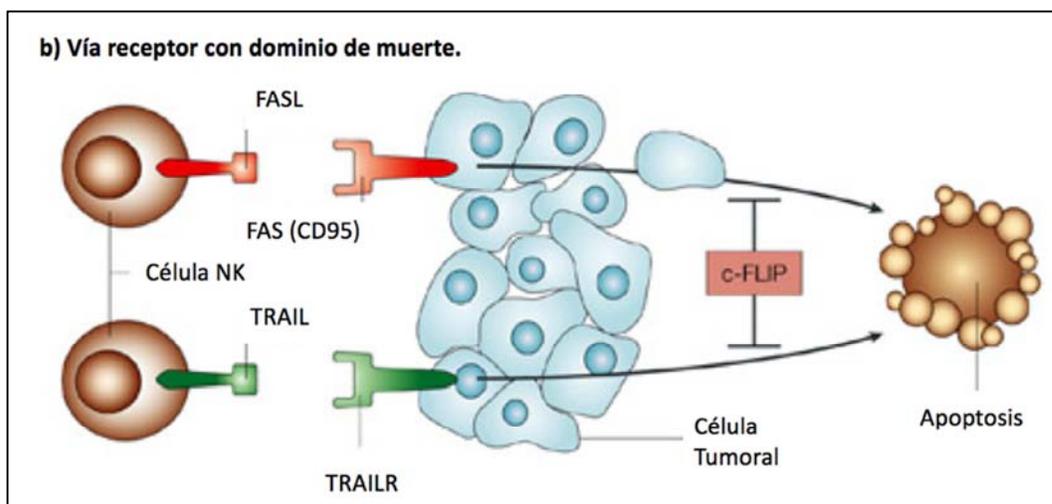


Figura 3. Receptor con dominio de muerte

Se observa que algunas células NK expresan el ligando de FAS (FASL) y el ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL), los cuales al unirse a su receptor (FAS y TRAILR) que se expresa en algunas células tumorales desencadena la muerte celular por apoptosis. La proteína C-FLIP inhibe la activación de la vía de las caspasas, impidiendo así la muerte celular. Modificado

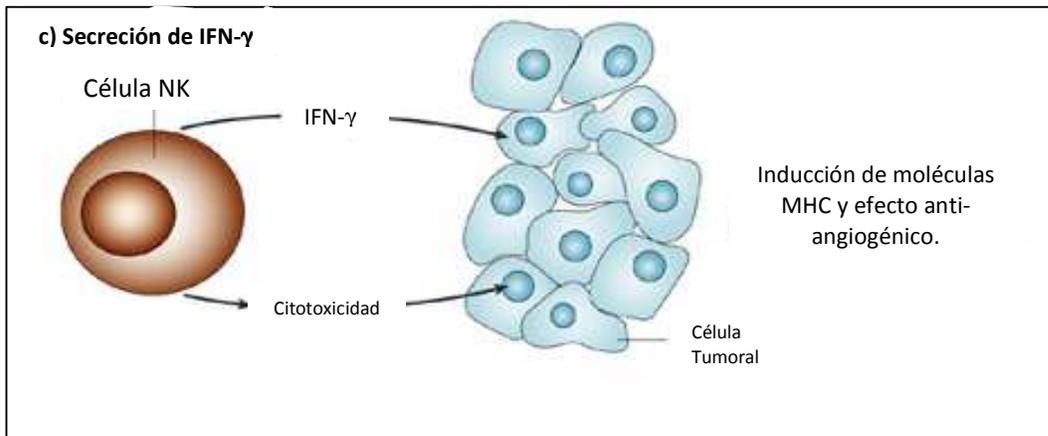


Figura 4. Secreción de Interferón Gamma

Se puede observar que las células NK secretan IFN- γ el cual ejerce efectos antitumorales (efecto antiangiogénico) en diferentes rutas en las células transformadas, además el interferón tiene como segundo efecto la sobreexpresión de moléculas del MHC de clase I.

1.6 Receptores KIR.

Los receptores KIR, una de las familias de receptores más estudiadas y más importantes de las células NK, son codificados por un conjunto de 14 genes y dos pseudogenes localizados todos ellos, en el brazo largo del cromosoma 19, (Figura 5) específicamente en la banda 13.4 (19q 13,4) dentro de un complejo denominado LRC (*Leucocyte Receptor Complex*).

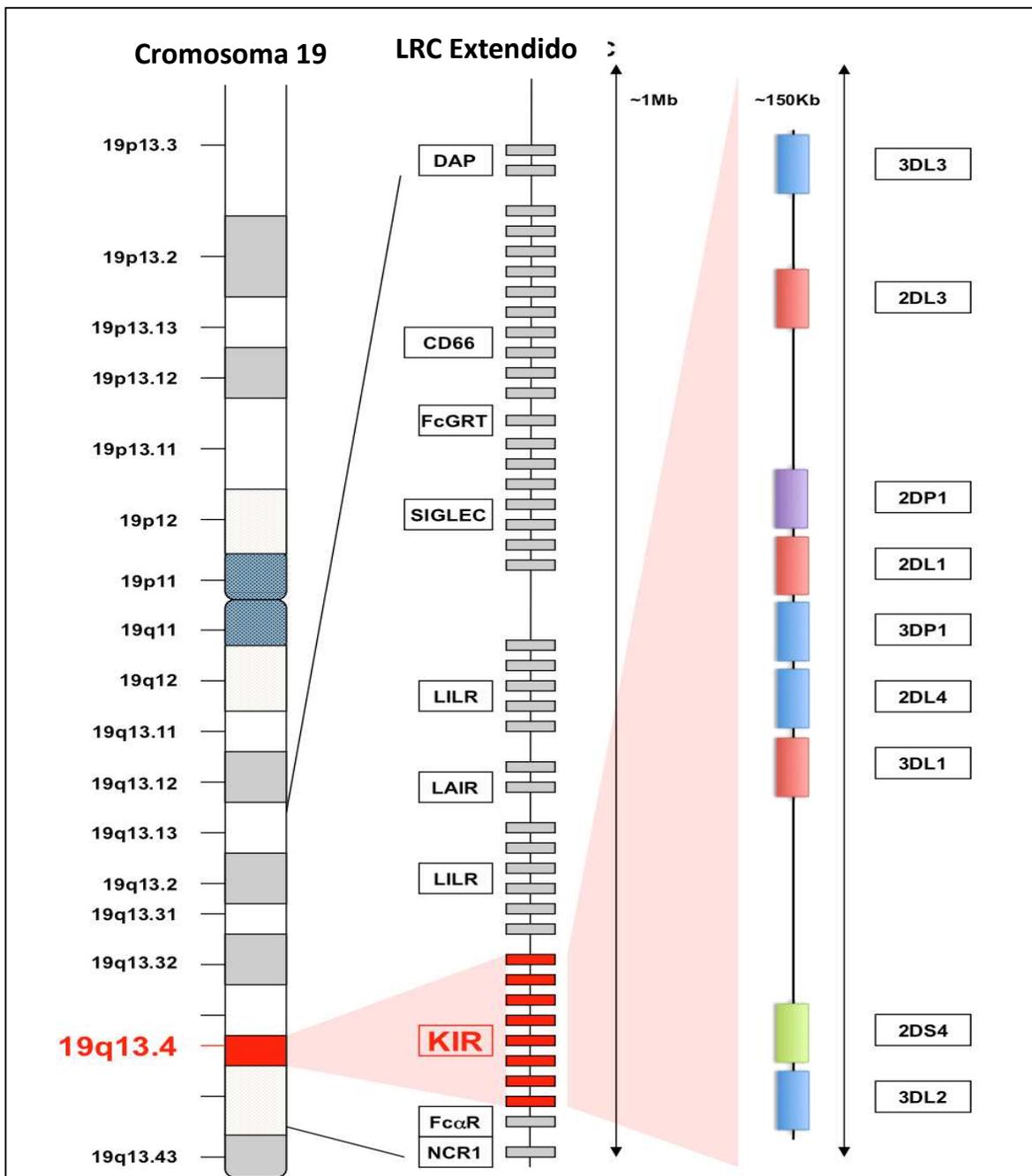


Figura 5. El complejo de receptores leucocitarios extendido y el haplotipo KIR.

Los genes KIR, se encuentra localizados dentro de una región de 150 Kb del complejo de receptores leucocitarios(LRC) en el cromosoma 19. El LRC con un tamaño total de 1 Mb, además de los genes KIR, contiene otros genes que codifican a elementos importantes como la proteína adaptadora DAP. En la figura se representa un haplotipo A, donde los cuadros azules representan los genes marco, los cuadros morados a los pseudogenes, los cuadros rojos los genes inhibidores y los cuadros verdes los genes activadores.⁵⁹

Dicho complejo abarca una región cromosómica de aproximadamente 1Mb, mientras que la familia KIR abarca aproximadamente 150 Kb. Estudios comparativos entre humanos y primates han permitido observar la rápida evolución de esta familia de genes, la cual es producto de eventos de duplicación y eliminación de genes así como de recombinación no recíproca.⁶⁰⁻⁶⁴

La nomenclatura de estos receptores está dada por el número de dominios extracelulares (2D y 3D) y la longitud de la región citoplasmática (S=short, L=Long) (Figura 6). Los pseudogenes no tienen la letra S o L, sino que se les asigna la letra P.⁶⁵

De manera general, los receptores que poseen una porción larga tienen asociadas a ella dos motivos de inhibición basados en tirosina (ITIM). De manera contraria, las regiones citoplasmáticas cortas poseen aminoácidos con carga positiva que permiten la interacción con proteínas adaptadoras (DAP12) las cuales poseen motivos de activación basados en tirosina (ITAM)⁶⁵⁻⁶⁷

Con base en lo anterior, los receptores inhibidores serán aquellos que poseen ITIMs y los de carácter activador poseerán ITAMs. Sin embargo, esta regla no se cumple con el receptor KIR2DL4, pues a pesar de poseer regiones citoplasmáticas largas sólo posee un motivo de inhibición y puede asociarse a la proteína adaptadora DAP 12, permitiendo que también posea características activadoras (Figura 6).^{68,69}

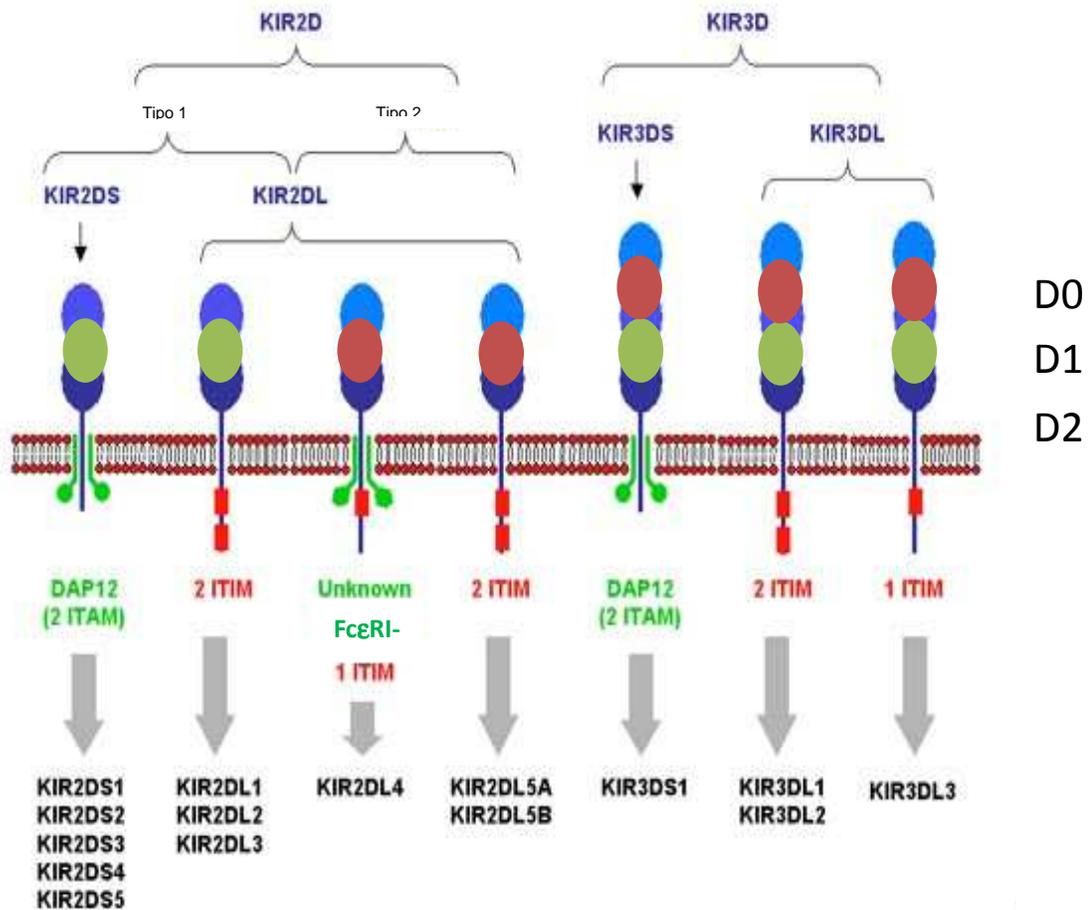


Figura 6. La estructura y la nomenclatura de los genes KIR.

Los receptores se nombran de acuerdo al número de dominios extracelulares, con 3 dominios (KIR3D) y 2 dominios (KIR2D), a pesar de que existen receptores con el mismo número de dominios, la secuencia de cada uno de ellos es diferente, pues como se observa en la figura, algunos receptores solo presentan los dominios 1 y 2 (verde y azul), mientras que otros poseen el dominio 0 y 2 (naranja y azul). Longitud de región citoplasmática larga (L) y corta (S). Los receptores con región citoplasmática corta (S) se asocian a proteínas adaptadoras (DAP12). Modificado de ⁵⁹.

Los ligandos de estos receptores son moléculas HLA de clase I, en especial las proteínas codificadas por los loci HLA-A, B y C. ⁷⁰

La interacción de los receptores inhibitorios con las moléculas de HLA están bien definidas, KIR2DL1, 2DL2 y 2DL3 son específicos para HLA-C, de manera específica, el primero de ellos se une a HLA-C con una lisina en la posición 80 (C2), los restantes se unen la HLA-C con una asparagina en posición 80 (C1). Las interacciones entre estos receptores varían en afinidad, siendo la unión de los receptores con C1 más estable que aquella que existe entre KIR2DL1 y C2. ^{24,71}.

Mientras tanto, *KIR3DL1* reconoce las proteínas codificadas por los alelos de HLA-B y algunos HLA-A con los motivos serológicos Bw4; *KIR3DL2* se une a HLA-A3 y -A11.^{72,73}

La interacción de las moléculas HLA con los receptores de tipo activador, no se encuentra del todo definida. Sin embargo se piensa que se unen a las mismas moléculas HLA que sus contrapartes inhibitorias aunque con menor afinidad. Por lo anterior, la expresión de moléculas de HLA define de manera importante el número de interacciones inhibitorias que pueden llevarse a cabo con los receptores de la célula NK.⁷⁴

1.6.1 La organización de los genes KIR en Haplotipos.

Los genes KIR se encuentran organizados genéticamente en haplotipos, es decir, como un grupo compacto de genes, que por su cercanía al momento de la división celular, se heredan en bloque. Uno de los haplotipos posee carácter activador (haplotipo B), mientras que el segundo tiene características inhibitorias (haplotipo A). Dichas características le son dadas de acuerdo a la presencia de genes que poseen, de esta manera el haplotipo B, contiene en su mayoría genes de tipo activador, mientras que el haplotipo A, posee principalmente, genes inhibidores.^{75,76}

Tanto el haplotipo A, como el B, se forman de la combinación de la región telomérica (TelA y TelB) y centromérica (CenA y CenB) de la región que comprende el LCR, cada región está flanqueada por un par de genes denominados genes marco, el gen *3DL3* y *3DP1* flanquean la región centromérica, mientras que *2DL4* y *3DL2* flanquean la región telomérica.^{75,76}

La combinación CenA-TelA da lugar al haplotipo A, mientras que el haplotipo B se forma por las combinaciones restantes (CenA-TelB, CenB-TelB, CenB-TelA) (Figura 7). El haplotipo B posee una mayor diversidad tanto en número de genes como variantes haplotípicas, además al parecer tiene una fuerte implicación en la actividad de la célula NK en su efecto contra las células leucémicas.

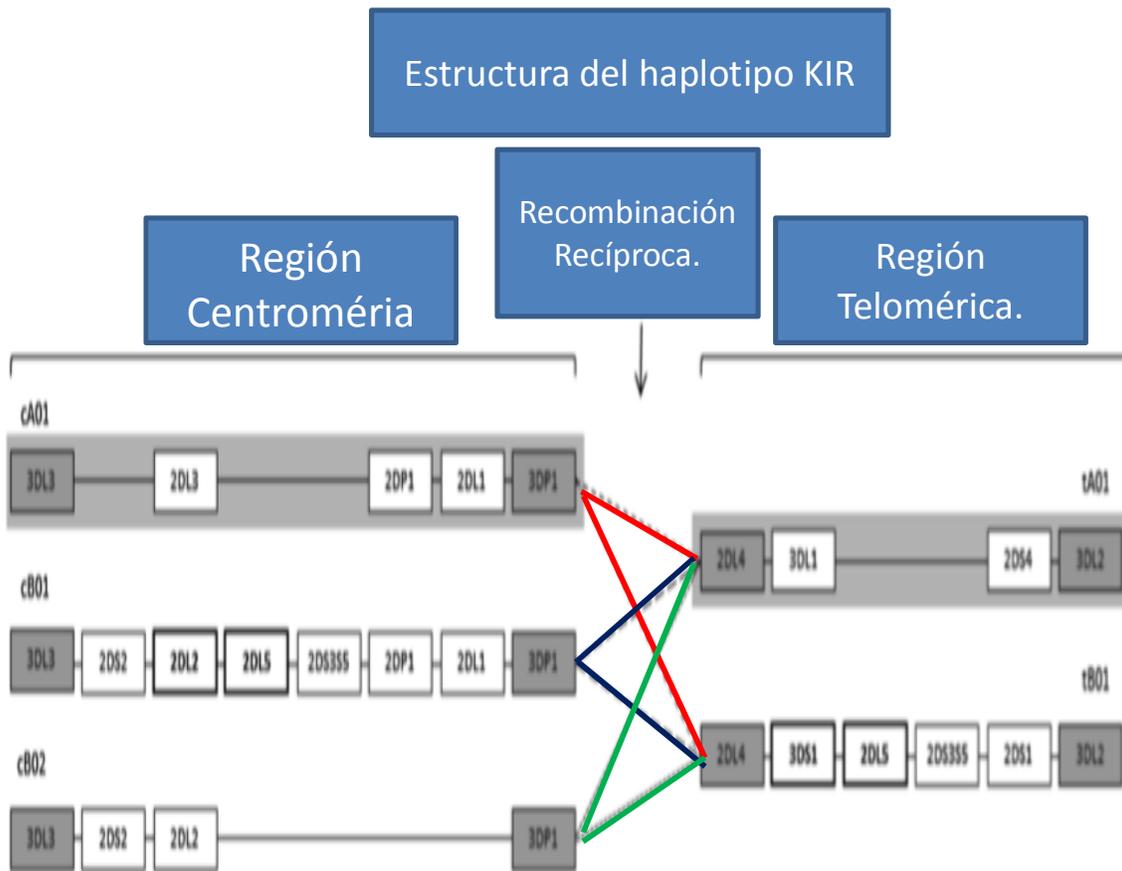


Figura 7. Formación de los haplotipos KIR.

Podemos observar en la figura que la formación del haplotipo KIR se da debido a eventos de recombinación recíproca entre dos regiones del LRC. En sombreado gris se ejemplifica la formación del haplotipo A, que solamente incluye la región CenA y TelA; cualquier otra combinación de centrómero o telómero, resulta en la formación de un haplotipo B. Se observa que la región centromérica B puede variar en el contenido de genes y en función de esto se asignan diferentes tipos de regiones, tanto centroméricas como teloméricas (cA01, cB01, cB02 tA01, tB02) Modificado de ⁷⁷

Tomando en cuenta esta organización genética, desde el punto de vista clínico, ha surgido una clasificación de los donadores con base en el contenido de B, estableciéndose grupos de donadores teniendo un contenido nulo (B score=0) cuando el haplotipo se da por la recombinación de CenA/A – TelA/A, hasta contenido total (B score = 4) cuando el haplotipo está formado por una recombinación CenB/B – TelB/B ⁷⁵.

1.7 El efecto injerto vs. leucemia.

Durante los primeros meses del trasplante, la eliminación de las células leucémicas residuales es mediada por las células NK. ⁷⁸

La distribución de los epítopes C1 y C2 es muy importante en el desarrollo del efecto injerto contra leucemia, el cual ocurre cuando el donador posee alguno de los epítopes y el paciente no, este tipo de reconocimiento se conoce como

“missing-self” o pérdida de lo propio, donde los receptores inhibidores de la célula NK no puede interaccionar con su ligando dada, la carencia del mismo, provocando así su actividad citolítica.^{78,79}

Una diferencia importante que repercute en la generación de reacciones alogénicas por parte de la célula NK, es que, a diferencia de los genes HLA, en donde hermanos comparten por lo menos un haplotipo, en los genes KIR los hermanos pueden o no compartir dichos haplotipos.^{78,79}

Diversos estudios demuestran que los pacientes cuyo donador posee un haplotipo B presentan una mejor respuesta frente las células leucémicas. Este efecto está dado principalmente por los genes de la región CenB y en menor medida por los de la región TelB.^{80,81}

1.8 Infecciones posteriores al trasplante de células hematopoyéticas.

Un riesgo importante que aumenta la morbilidad y la mortalidad de los pacientes sometidos al trasplante, es la incidencia de infecciones, ya sea de tipo bacteriana, viral o fúngica.^{82,83}

El riesgo de contraer alguna infección se relaciona al periodo de neutropenia generado por el esquema de acondicionamiento; sin embargo, también este riesgo está presente hasta los 24 meses posteriores al trasplante. Lo anterior debido a la aplicación de inmunosupresión secundaria para disminuir la incidencia y severidad de la EICH.^{82,83}

La mayoría de las infecciones bacterianas y fúngicas, son causadas por microorganismos que colonizan la boca, la piel, intestinos y tracto respiratorio. Mientras que las infecciones de tipo viral son consecuencia de la reactivación de algún virus latente en el receptor, o la adquisición del mismo por medio de transfusiones sanguíneas.^{82,83}

Los principales agentes causantes de estas infecciones son bacterias capsuladas, cándida y virus como el citomegalovirus, herpes simple y varicela zoster. Como estrategia para evitar la aparición de infecciones se procura aislar al paciente en cuartos con flujo laminar, alimentos estériles, la aplicación de factores hematopoyéticos de crecimiento y agentes antimicrobianos.⁸³

1.9 Enfermedad Injerto vs Hospedero (EICH).

El término de EICH fue propuesto en 1996 por Billingham, como una serie de eventos inmunológicos entre el tejido del receptor y el injerto, tiene que cumplir con tres criterios mínimos para ser considerada como EICH.⁸⁴

- a) El injerto tiene que contener células inmunocompetentes.
- b) El receptor tiene que estar inmunocomprometido.
- c) Antígenos tisulares del hospedero diferentes a los del donador.

Se presenta en dos formas clínicas: aguda y crónica, cada una de ellas con características temporales, inmunológica y tisulares específicas.

La EICH se clasifica como aguda cuando se presenta en los primeros días posteriores al trasplante, mientras que cuando ocurre después de los 100 días posteriores al trasplante se le denomina crónica. La forma aguda daña principalmente al hígado, piel y tracto gastrointestinal, mientras que la forma crónica simula a una enfermedad autoinmune pues generalmente ataca a más de un órgano y tejido a la vez.⁸⁴

Otra clasificación de la EICH consiste precisamente en la extensión del daño inmunológico, se define como localizada, cuando solamente daña a un órgano o tejido en específico, o extensa cuando se ven comprometidos más de dos órganos.⁸⁵

La EICH representa la principal complicación después del TCH y a pesar de que existen en los centros hospitalarios una serie de acciones profilácticas (e.g. inmunosupresión del receptor) para evitar su incidencia, actualmente más del 60% de los pacientes que reciben TCH padece algún tipo y grado de EICH.⁸⁵

Tanto la EICH, como el efecto injerto vs. leucemia se relacionan entre sí. Existe evidencia que demuestra que la intensidad de la EICH es inversamente proporcional a la probabilidad de una recaída en el paciente, es decir que si éste padece algún grado de EICH, al mismo tiempo ocurre la eliminación de las células leucémicas residuales, lo que disminuye el riesgo de recaída.⁸⁵

En el desarrollo de la enfermedad injerto contra hospedero se ven involucradas distintas poblaciones celulares como linfocitos T y B, células NK, monocitos/macrófagos y células dendríticas. Estas poblaciones celulares están muy bien estudiadas y caracterizadas en modelos animales, sin embargo su estudio ha sido complicado en la patogénesis en humanos.^{86,87}

Los estudios que se han realizado en pacientes, consisten en eliminar ciertas poblaciones celulares y observar el impacto que se tiene en el desarrollo de la enfermedad. Estos trabajos arrojaron evidencia que demuestra el papel pro-EICH de las células B y T y de la función preventiva de los monocitos y de las células NK.^{88,89}

1.10 La importancia del sexo en el TCH.

A pesar de que existen reportes que señalan que el sexo del donador no tiene implicación en el establecimiento del trasplante, es evidente un aumento en la incidencia de EICH en aquellos pacientes masculinos con donantes femeninos.⁸⁶

Aunque la base de la EICH es la diferencia antigénica entre donador y paciente, algunos estudios apuntan a que los antígenos con la capacidad para desarrollar una respuesta contra el tejido sano del receptor, son diferentes a los que participan en el efecto injerto contra leucemia. Lo anterior está basado en el hecho de que existe este último fenómeno en ausencia de EICH.⁸⁶

Con base en lo anterior, algunos de los antígenos que participan en el efecto contra leucemia, pueden estar codificados en el cromosoma Y, pues como se mencionó anteriormente los receptores masculinos presentan un índice mayor de EICH y de efecto injerto contra leucemia cuando poseen donantes femeninas.^{90,91}

Lo anterior abre las puertas a la búsqueda de los antígenos específicos que participan en el efecto injerto contra leucemia, pues en un futuro de algún modo se podría favorecer su expresión y generar una respuesta inmune sin la necesidad de padecer las complicaciones de la EICH.⁸⁷

1.11 Biomarcadores en HSCT.

Un biomarcador se define como una característica que puede ser medida de manera objetiva como un indicador de algún proceso biológico, patogénico o farmacológico.⁹²

Entre las características que debe de tener un biomarcador es su fácil accesibilidad y bajo costo de utilización, además debe estar relacionado con el evento biológico que se estudia y brindar información nueva que genere conocimiento predictivo.⁹³

Al ser la enfermedad injerto contra hospedero la principal complicación y causa de muerte después de un trasplante de células hematopoyéticas, muchos de los estudios para localizar biomarcadores se han enfocado en la prevención de dicho padecimiento. Algunos de los tipos de biomarcadores más frecuentes son los antígenos de histocompatibilidad, pues se conoce que la gravedad de la enfermedad injerto contra hospedero es directamente proporcional al grado de incompatibilidad en los antígenos HLA. Sin embargo, aún en pacientes trasplantados compatibles en HLA con su donador, se desarrolla EICH aunque con menos gravedad.^{24,93}

Por lo anterior, algunos estudios ahora se orientan a determinar la participación de los antígenos menores de histocompatibilidad, los cuales en la práctica clínica no son tipificados. Algunos de estos antígenos son HA-1, HA-2, HB-1, y BCL2A1, los cuales se caracterizan por localizarse casi exclusivamente en células hematopoyéticas, mientras que otros, como los antígenos H-Y, HA-3, HA-8 y UGT17 son ubicuos.^{90,91}

Dejando de lado a los antígenos HLA y su alto nivel polimórfico, existen otros genes que codifican para citocinas involucradas en la respuesta inmune que presentan polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) y que parecen estar involucrados en el riesgo de incidencia de EICH agudo y crónico. Algunos de los genes que se han encontrado con relación al riesgo de EICH son TNF- α , IL-6, IFN-g, IL10, IL-22 e IL23.^{95,96}

También se encontró que pequeñas secuencias regulatorias, de 20 a 25 nucleótidos de tamaño, conocidos como miRNAs, se pueden detectar y

cuantificar desde muestras de fluidos por RT-PCR. Sirven también como biomarcadores de la EICH de tipo agudo. Especialmente se ha asociado la sobre regulación de miR-155 en EICH agudo, mientras que miR-133 se encuentra desregulado en el mismo tipo de EICH.^{97,98}

Otro tipo de biomarcador estudiado en el trasplante de células hematopoyéticas son los marcadores celulares, principalmente la caracterización y conteo de células T reguladores (Treg) que están involucradas en el proceso de tolerancia inmunológica, definidas por sus marcadores de membrana CD4+ CD25+ FOXP3+. Se ha observado que la ausencia de estas células en los pacientes se relaciona con la incidencia de EICH.^{97,98}

2 Planteamiento del problema.

La principal complicación del trasplante de células hematopoyéticas es la incidencia de la enfermedad injerto contra hospedero en alrededor del 60% de los pacientes.

En los primeros meses del trasplante, la célula NK es la encargada de la eliminación de las células leucémicas residuales y participa en las reacciones inmunológicas presentes en la EICH.

En la práctica clínica, solamente se realiza el estudio de compatibilidad para las moléculas de HLA, sin tomar en consideración los genes KIR, a pesar de que algunos centros de trasplante realizan la tipificación de estos genes, los resultados obtenidos se quedan regularmente en datos de investigación y no tienen una repercusión en la clínica.

Con base en la evidencia de la interacción de las moléculas de HLA y los receptores KIR y de la importante participación de las células NK en la recuperación del paciente después del trasplante, es importante realizar un estudio de genotipificación de dichos genes para identificar posibles indicadores de pronóstico médico.

3 Hipótesis.

Si las células NK que se generan a partir del injerto, cuentan con un haplotipo activador y un contenido de B con score alto (3 o 4) se espera un menor riesgo de recaída, una mayor sobrevida y mayor incidencia de la EICH en pacientes que reciben TCH.

4 Objetivo General.

Genotipificar los 14 genes y 2 pseudo-genes KIR y relacionar los resultados con la incidencia de EICH, frecuencia de recaída y sobrevida de los pacientes post-trasplante.

5 Objetivos Particulares.

- Genotipificar los receptores KIR a partir de las muestras obtenidas y clasificar a los donadores de acuerdo a su haplotipo y contenido de B.
- Calcular las frecuencias de los genes individuales en pacientes y donadores.
- Relacionar el haplotipo KIR y/o el contenido de B con la incidencia de la EICH, la frecuencia de recaída y la sobrevida de los pacientes.

6 Material y métodos.

6.1 Receptores de trasplante.

Dentro de este estudio, participaron un total de 68 pacientes adultos del Hospital de Especialidades CMN SXXI con algún diagnóstico de enfermedades hematológicas, candidatos a trasplante de células hematopoyéticas, con un donador familiar y con pruebas HLA idénticas de mediana resolución. A los pacientes se les informó sobre el objetivo del protocolo y accedieron a participar mediante la firma de un consentimiento informado.

6.2 Obtención de material genético.

El material genético se obtuvo a partir de sangre periférica del binomio (donador-paciente) antes del trasplante y 150 días posterior se realizó una segunda extracción sólo al receptor post-trasplante.

La extracción de DNA se realizó mediante la técnica de precipitación con perclorato de sodio.

Se procedió a centrifugar un tubo de biometría de 5 mL, que utiliza como agente anticoagulante EDTA, a 10,000 rpm por 5 minutos, posteriormente se retiró cuidadosamente el plasma.

Se traspasó el contenido del tubo de biometría a un tubo falcon de 50 mL, lavando el residuo del tubo de biometría con buffer de lisis de eritrocitos, el cual se prepara disolviendo en 80 mL de agua destilada: 0.83 gramos de cloruro de amonio, 0.1 gramos de bicarbonato de potasio, y 0.2mL de EDTA 0.5M a un pH= 8.

El tubo falcón se llevó a un volumen final de 40mL, se realizó la lisis de los eritorocitos con ayuda del vórtex, finalmente se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 segundos y se decantó el contenido. El botón que quedó al fondo del tubo se disgregó agregando 40 mL de buffer de lisis de eritrocitos y con ayuda del vórtex.

Se centrifugó una vez más y se decantó el contenido, el botón de leucocitos debe estar blanco, de lo contrario se procede a otro paso de lavado con buffer de lisis de eritrocitos.

Cuando el botón se encontró limpio, se re-suspendió en 2 mL de buffer de lisis de leucocitos sometiendo a vórtex, terminando de disgregar el botón se traspasó a un tubo Eppendorf, se adicionaron 10 μ L de SDS al 20% y 110 μ L de perclorato de sodio 5M, el tubo con la mezcla se agitó cuidadosamente durante 10 minutos.

Terminado el agitado se agregaron 200 μ L de NaCl 5M agitando vigorosamente. Se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos.

Se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo y se agregó un volumen equivalente de isopropanol frío, se mezcló cuidadosamente y se pudo observar la precipitación de las hebras de DNA.

Se realizó una centrifugación a 12,000 rpm por 5 min y se decantó el contenido. El botón de DNA se lavó 3 veces usando etanol al 70%, en cada lavado, se agitó cuidadosamente y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos.

Terminando los 3 lavados el botón de DNA se disolvió en 100 μ L de agua desionizada estéril.

6.3 Cuantificación del DNA.

El DNA se cuantificó utilizando el principio de la espectrofotometría, utilizando el sistema Nanodrop 1000 Spectrophotometer Thermo Scientific.

El sistema se calibró utilizando 1 μ L de agua desionizada y posteriormente utilizando la misma cantidad de DNA se realizaron las cuantificaciones.

6.4 Genotipificación de genes KIR.

La genotipificación se realizó utilizando el KIR Genotyping SSP Kit de Invitrogen, el cual consta de una placa de 96 pozos, con 24 pozos para cada prueba, en el pozo número 23 se coloca un control negativo. Cada pozo contiene primers o iniciadores de secuencia específica, los cuales se unen a los extremos 3' y 5' de la región del gen (KIR) que nos interesa amplificar.

Por indicaciones del inserto, el DNA utilizado para la tipificación se normalizó a una concentración de 100 ng/ μ L, utilizando para la prueba un volumen final de 25 μ L.

En el tubo incluido en el kit con el Buffer de PCR se agregó 60 μ L de agua desionizada estéril, 2.4 μ L de Taq Polimerasa (Roche), se mezcló y se colocaron 8 μ L de la mezcla de PCR en los 4 tubos de control negativo de la placa.

Posteriormente se agregó el DNA de las muestras, se mezcló nuevamente y se agregó 8 μ L a cada uno de los pozos restantes.

Después de sellar la placa se corrió el programa de amplificación en el termociclador, el cual se indica en el inserto del kit.

Paso 1.	1 minuto a 95°C
Paso 2	30 ciclos de 94°C 20 segundos.
	63°C 20 segundos.
	72°C 90 segundos.
Mantener	4°C.

Después de terminar el proceso de amplificación se realizó la electroforesis, para ello se preparó un gel de agarosa al 2%, durante 30 minutos utilizando 80 volts de corriente.

Los resultados se interpretaron mediante la presencia o ausencia de fragmentos de amplicación presentes en el gel, conforme al protocolo suministrado por el proveedor.

6.5 Seguimiento clínico.

El seguimiento de los binomios se ha dado desde el régimen de acondicionamiento hasta que cumplieron 700 días posteriores al trasplante, en los casos que los pacientes continuaron con vida, evaluando distintas variables como: edad y género del donador, edad y género del receptor, esquema de acondicionamiento, diagnóstico inicial y grupo sanguíneo.

Durante este tiempo de seguimiento se ha analizado el periodo de reconstitución mieloide, el cual se considera a partir de que el paciente muestra tres días consecutivos con un conteo de neutrófilos de más de 200 células por milímetro cúbico de sangre, la presencia de EICH basada en los reportes médicos, eventos de recaída considerados una vez que las pruebas de quimerismo demuestran una disminución de más del 50% de las células injertadas y reportadas en el expediente clínico, y finalmente fallecimientos.

6.6 Clasificación de los pares donador-receptor.

Pacientes y donadores fueron clasificados de acuerdo a los resultados obtenidos de la tipificación KIR conforme a su contenido de genes como genotipo AA o Bx según el caso, además también fueron catalogados conforme al contenido de B.

Se define como genotipo AA aquel paciente que presente solamente los genes KIR3DL3, KIR2DL3, KIR2DL1, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR2DS4 y KIR2DL4, mientras que sujetos que presenten uno o más de los siguientes genes se cataloga como genotipo Bx, KIR2DL2, KIR2DL5, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5, KIR2DS1 Y KIR3DS1.

Los haplotipos KIR se generan de eventos de recombinación entre una región centromérica y una telomérica, las cuales pueden ser definidas como A o B dependiendo de la presencia de genes.

El contenido de B toma en cuenta esta recombinación y categoriza como puntaje 0 a los sujetos en los que sus dos haplotipos, materno y paterno, tienen una recombinación de centrómeros y telómeros A/A.

El puntaje cuatro es para aquellos sujetos cuyos dos haplotipos recombinan el centrómero y telómero B/B.

Los puntajes intermedios resultan de las diferentes combinaciones que se pueden dar, centrómero/telómero A/B.

6.7 Análisis estadístico.

Las variables estudiadas, frecuencia de EICH, recaída y sobrevida, fueron analizadas considerando la presencia o ausencia de los genes de manera individual, con respecto al genotipo y en función del contenido de B, la relación entre éstas se estudió mediante la prueba de chi cuadrada, al ser variables dicotómicas (ausencia/presencia), asignando una diferencia significativa con un valor de $p < 0.05$ utilizando el paquete estadístico SPSS 22.

El riesgo relativo (RR), es una razón que identifica la magnitud o fuerza de la asociación, lo que permite comparar la frecuencia con que ocurre el evento entre los que tienen el factor de riesgo y los que no lo tienen. El rango de su valor oscila entre 0 e infinito.

La sobrevida de los pacientes fue analizada tanto por la prueba de chi cuadrada como por la prueba de log-rank usando los gráficos de Kaplan-Meier, considerando también la existencia de diferencia significativa al encontrar un valor de $p < 0.05$ y reportando el riesgo relativo junto con los índices de confianza al 95%.

7 Resultados.

7.1 Descripción de la población de estudio.

Durante este trabajo se estudiaron un total de 68 parejas donador-receptor, a los cuales se les dio un seguimiento clínico de 700 días. La descripción con los datos demográficos se muestra en la tabla 2.

En la tabla 3 podemos observar el resultado de la genotipificación, de acuerdo al genotipo obtenido y al contenido de B.

Tabla 2. Datos Demográficos de Pacientes Pre-Trasplante y Donadores. n=68		
	Receptores	Donadores
Edad (Años), Media \pm DE	30 \pm 8	34 \pm 10
Sexo		
• Masculino	38 (56%)	33 (49%)
• Femenino	30 (44%)	35 (51%)
Diagnóstico n (%)		
• LMA	31 (46%)	---
• LMC	3 (4%)	---
• LLA	21 (31%)	---
• Anemia aplásica	5 (7%)	---
• Mielodisplasia	4 (6%)	---
• Inmunodeficiencia	1 (1%)	---
• Leucemia Bifenotípica	2 (3%)	---
• LLC	1 (1%)	---
Compatibilidad HLA n (%)		
• 10/10	68 (100%)	---

Tabla 2. Leucemia mieloide aguda (LMA), Leucemia Mieloide Crónica (LMC), Leucemia linfocítica aguda (LLA). No existe una diferencia significativa entre la edad y el sexo de los pacientes y donadores. Los diagnósticos más frecuentes en la población de estudio resultó ser LLA y LMA, sumando juntos más del 70% del total. La compatibilidad entre paciente y donador a mediana resolución para los loci HLA-A, -B, -C, -DR y -DQ es del 100% en todos los casos.

Tabla 3. Resultados de la genotipificación de pacientes y donadores.		
Genotipo KIR		
• AA	18 (26%)	9 (13%)
• Bx	50 (74%)	59 (87%)
Contenido de B		
• 0	18 (26%)	9 (13%)
• 1	19 (28%)	10 (15%)
• 2	27 (40%)	41 (60%)
• 3	3 (4%)	8 (12%)
• 4	1 (1%)	0 (0%)
Tiempo de reconstitución mieloide (días) Media ± DE	14.4 ± 2.9	---

Tabla 3. No existe una diferencia significativa entre la frecuencias de los genotipos AA y Bx en pacientes y donadores, a pesar de que los porcentajes pudieran sugerir lo contrario ($p=0.053$). Tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones de cada uno de los scores o puntajes del contenido de B entre ambos grupos. El tiempo de reconstitución mieloide, en promedio, se alcanza en los 14 días posteriores al trasplante.

7.2 Frecuencia genes activadores e inhibidores.

En la gráfica 1 y 2 podemos observar las frecuencias para los genes de tipo inhibidor y activador, respectivamente. Estas frecuencias fueron obtenidas por conteo manual considerando la ausencia o la presencia de los genes en los resultados de la genotipificación, siguiendo las recomendaciones del inserto.

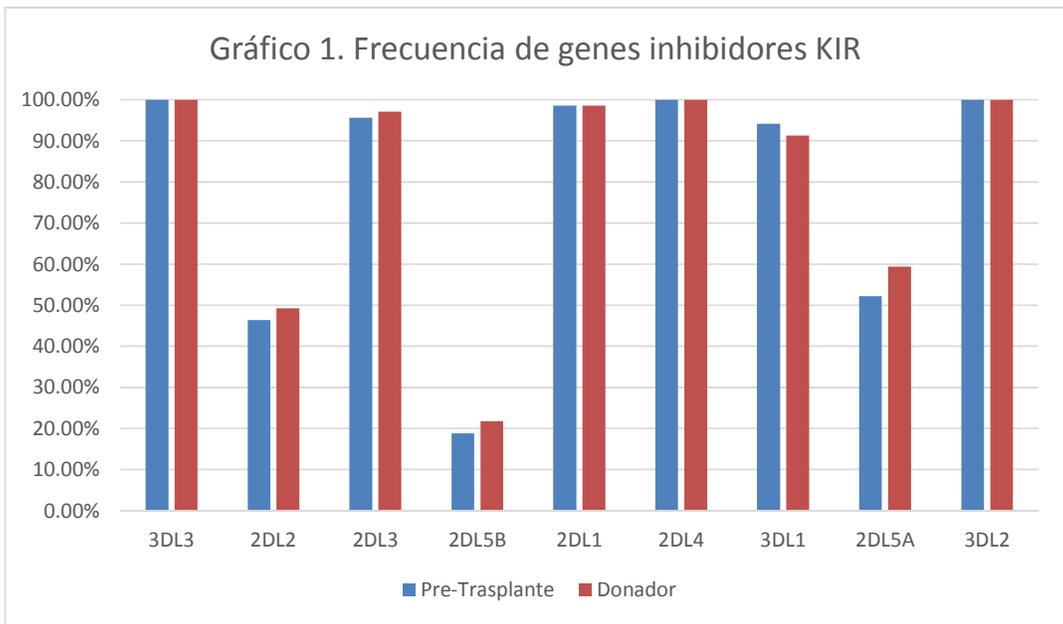


Gráfico 1. Podemos observar que no existen diferencias entre las frecuencias de los genes inhibidores de los pacientes pre-trasplantes (azul) y los donadores (rojo). El receptor KIR2DL5A es el que mayor diferencia presenta, sin embargo, no resulta significativa en la prueba de chi cuadrada.

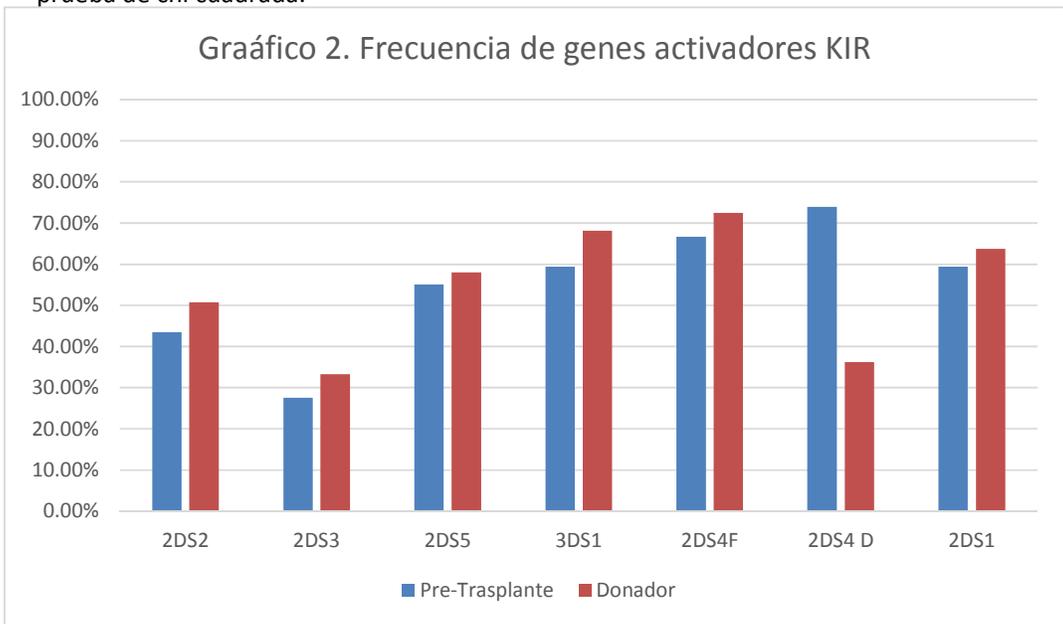


Gráfico 2. Ninguno de los receptores de tipo activador presenta una diferencia significativa, excepto el gen KIR2DS4D, el cual está en una mayor frecuencia en los pacientes, sin embargo, no existe ningún reporte que asocie la presencia o ausencia de dicho gen con la evolución del pacientes post-trasplante.

Las variables clínicas evaluadas a lo largo del estudio fueron la frecuencia de la EICH, la recaída y la sobrevida en los pacientes.

Cada una de ellas fue analizada de acuerdo a la frecuencia de los genes, el genotipo y el contenido de B de los donadores. La asociación de los datos clínicos con el seguimiento post-trasplante de los pacientes se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Asociación de datos clínicos con variables genéticas de los receptores KIR.

	Sin EICH	EICH	SinRecaída	Recaída	Vivos	Fallecidos
	17 (25%)	51 (75%)	55 (81%)	13 (19%)	57 (84%)	11 (16%)
Genotipo						
• AA	6 (35%)	3 (6%)	6 (11%)	3 (23%)	7 (12%)	2 (18%)
• Bx	11 (75%)	48 (94%)*	49 (89%)	10 (77%)	50 (88%)	9 (92%)
Contenido de B						
• 0	6 (35%)	3 (6%)	6 (11%)	3 (23%)	7 (12%)	2 (18%)
• 1	2 (12%)	8 (16%)	4 (7%)	6 (46%)*	7 (12%)	3 (27%)
• 2	9 (53%)	32 (63%)	37 (67%)	4 (31%)*	38 (67%)	3 (27%)*
• 3	0 (0%)	8 (16%)	8 (15%)	0 (0%)	5 (9%)	3 (27%)

Tabla 4. La frecuencia de EICH en los pacientes es estadísticamente más alta cuando su donador posee un genotipo KIR (p=0.0058) RR= 2.44 (IC95% = 0.96 - 6.20), no se encuentra ningún comportamiento similar que relacione la sobrevida o la incidencia de recaída con la presencia de determinado genotipo KIR. EL contenido de B, con puntaje 1, se relaciona a un aumento en el riesgo de presentar recaída (p=0.035) RR=4.97 (IC95%= 2.10-11.74), mientras que el contenido 2 en el donador, disminuye este riesgo (p=0.033) RR= 0.29 (IC95% = 0.10-0.86). El puntaje o contenido 2 también se relaciona con una mayor tasa de sobrevida en los pacientes (p=0.026) RR= 0.2470 (IC95% = 0.071-0.848).

De primer instancia podemos observar que la incidencia de EICH en nuestros pacientes fue del 75 y que la recaída en la enfermedad ocurre en aproximadamente 20% de los casos, mientras que los pacientes que al final del seguimiento fallecieron son un 16% del total inicial.

La incidencia de EICH es claramente más alta en aquellos pacientes que reciben el injerto de donadores con genotipo Bx, ya que dicho genotipo está presente en el 94% de los casos y además presenta características activadoras, por lo tanto el genotipo AA representa un menor riesgo de desarrollar EICH, esta diferencia es significativa con un valor de p=0.0058 con RR=2.44, IC 95% (0.96-6.20), que indica que la presencia del genotipo Bx en el donador aumenta el riesgo de que el paciente desarrolle EICH.

No se encontró ninguna relación entre los distintos contenidos de B y la frecuencia de desarrollo de EICH.

La siguiente variable clínica analizada es la recaída, en la cual notamos que la proporción de genotipos inhibidores (AA) y activadores (Bx) es similar en los pacientes con y sin recaída, por lo cual no podemos establecer ninguna relación significativa.

En el análisis de contenido de B, el puntaje 1 muestra una frecuencia más alta en la incidencia de recaída teniendo un valor significativo de $p=0.035$ con (RR=4.97 IC95%= 2.10-11.74), esto significa que los pacientes que reciben un trasplante de donadores Bx, con contenido de B=1 tienen casi 5 veces más riesgo de recaer en la enfermedad.

Se espera que en aquellos pacientes que cuentan con un donador con un contenido de B alto, el riesgo de recaída sea menor, lo cual se comprueba al observar que el puntaje 2 se asocia con un menor riesgo al tener un valor de $p=0.033$ con (RR=0.29 IC 95% 0.10-0.86). El puntaje 3, el cual es el más alto en nuestra población de estudio, no estuvo presente en ningún paciente que haya padecido recaída.

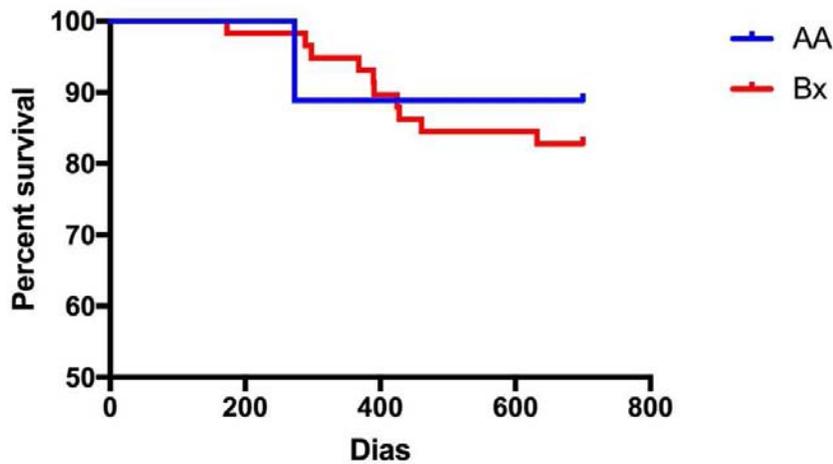
Finalmente se analizó si existía alguna relación entre las variables genéticas de los receptores KIR y la sobrevida de los pacientes, observando que los genotipos AA y Bx también muestran frecuencias muy similares y por lo tanto no se asocian con dicho evento.

El único puntaje que arrojó diferencia significativa fue el 2, el cual tiene un valor de $p=0.016$ con RR=0.25 y con IC95% (0.07-0.85), lo cual significa que este contenido de B en donadores se puede asociar a que el paciente tenga una sobrevida mayor.

En la gráfica 3 podemos observar el comportamiento de las curvas de sobrevida con respecto al genotipo KIR del donador (AA o Bx), como podemos observar en dicho gráfico, no existe ninguna diferencia significativa, según el análisis de Log-Rank.

Ese mismo análisis se refleja en la gráfica 4, sin embargo, ahora se comparan las curvas de sobrevida con respecto al contenido de B, se obtuvo como resultado un valor de RR=7.98 con IC 95% (1.27-49.88) para el puntaje 1, lo que nos indica que existe una probabilidad más alta de muerte en aquellos pacientes con donador que posean dicho contenido. El contenido 1 y 3 a pesar de tener en porcentaje diferencias considerables, no fueron significativas pues la n que se tiene para esos puntajes es pequeña.

Sobrevida de los pacientes de acuerdo a Genotipo KIR



Gráfica 3. Podemos observar el comportamiento de las gráficas de sobrevida en los pacientes, de acuerdo al tipo de genotipo que posee su donador. Los dos pacientes cuyo genotipo del donador es AA fallecieron en tiempo similares, posterior a estos fallecimientos el porcentaje de población viva se mantuvo cerca del 90%. Los fallecimientos de pacientes con donadores con genotipo Bx, ocurren a diferentes tiempos, al final de los 700 días de seguimiento el porcentaje de sobrevida es ligeramente menor, pero no llega a ser estadísticamente significativo.

Sobrevida de pacientes de acuerdo a contenido de B.

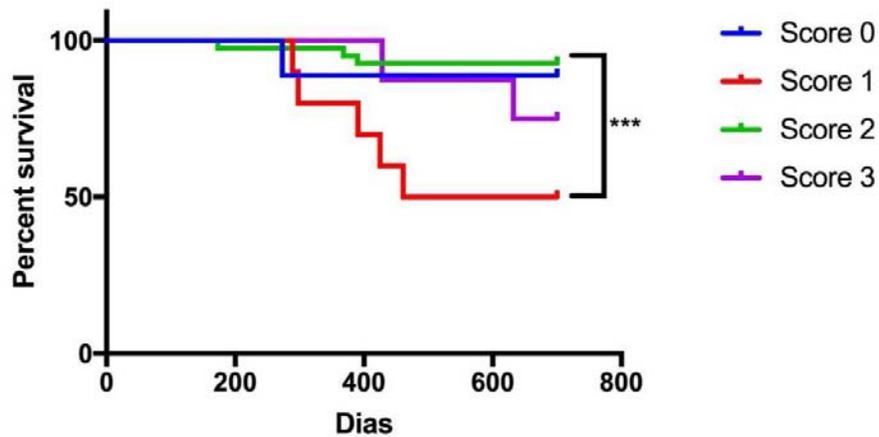


Gráfico 4. El porcentaje de pacientes con donador que tiene puntaje 1 es evidentemente el más bajo, y resulta estadísticamente significativo, cuando se compara con la curva de sobrevida de los pacientes con donador con puntaje 2, resultando un factor de riesgo al obtener $RR=7.98$ con $IC95\%$ (1.27-49.88). A pesar de que visualmente se pueda apreciar una diferencia entre los puntajes 1 y 2, la p no llega a ser significativa ($p=0.071$).

Además de las comparaciones con base en las frecuencias de genotipos y contenido de B, se realizó el análisis considerando la presencia o ausencia de los genes. Se encontró la asociación del gen activador KIR2DS5 y el desarrollo de EICH, el valor resultante de $RR = 1.40$ con IC 95% (1.01-1.94), nos indica que la probabilidad de que el paciente desarrolle EICH aumenta si el donante presenta en su genotipo dicho gen.

Finalmente para comprobar que los resultados que obtuvimos durante nuestro análisis no dependían de algún diagnóstico inicial en los pacientes, comparamos las poblaciones que padecían LMA y LLA, como lo muestran las talas 5 y 6 respectivamente.

Tabla 5. Datos Demográficos de los pacientes con LMA y LLA		
	Pacientes LMA	Pacientes LLA
Número de pacientes (n)	31	21
Edad, (Años), Media \pm DE	33 \pm 9	30 \pm 10
Sexo.		
• Masculino	15 (48%)	15 (71%)
• Femenino	16 (52%)	6 (29%)
Compatibilidad HLA n (%)		
• 10/10	31 (100%)	21 (100%)
Genotipo KIR		
• AA	10 (32%)	5 (24%)
• Bx	21 (68%)	16 (76%)
Contenido de B		
• 0	10 (32%)	5 (24%)
• 1	8 (26%)	6 (29%)
• 2	10 (32%)	8 (38%)
• 3	2 (6%)	2 (10%)
• 4	1 (3%)	0 (0%)
Tiempo de reconstitución mieloide Media \pm DE	14.5 \pm 2.9	14.4 \pm 2.4

Tabla 5. No existe ninguna diferencia significativa entre ambos grupos de pacientes, considerando la edad y el sexo. Tampoco se encontró alguna diferencia con respecto a el genotipo KIR o el contenido de B. Los tiempos de recuperación mieloide en ambos grupos de pacientes son, en promedio, 14 días.

Como puede verse en la tabla 5, no existe ninguna diferencia marcada entre los pacientes que padecen LMA y los que padecen LLA, pues la edad, la distribución de los genotipos y del contenido de B son similares en ambos grupos.

La frecuencia de los genes KIR activadores e inhibidores se muestran en los gráficos 5 y 6 respectivamente.

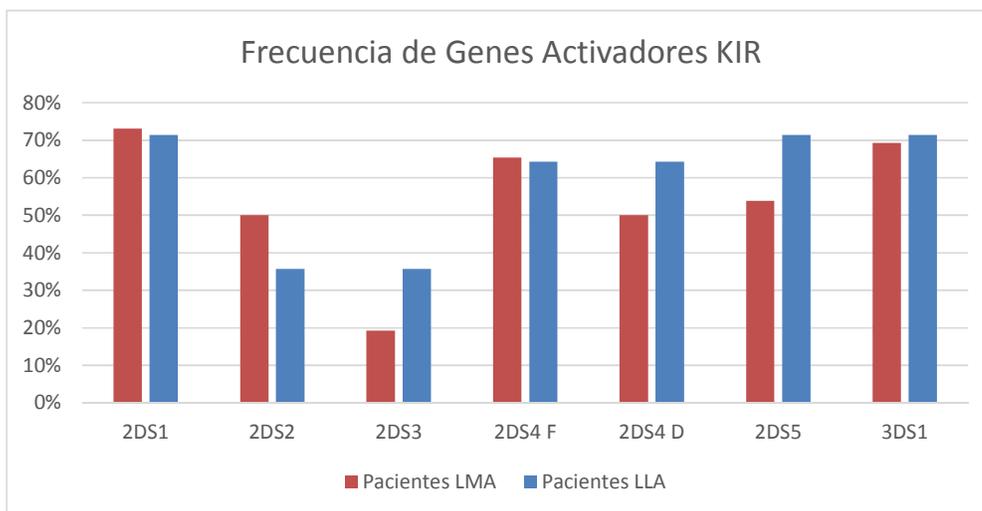
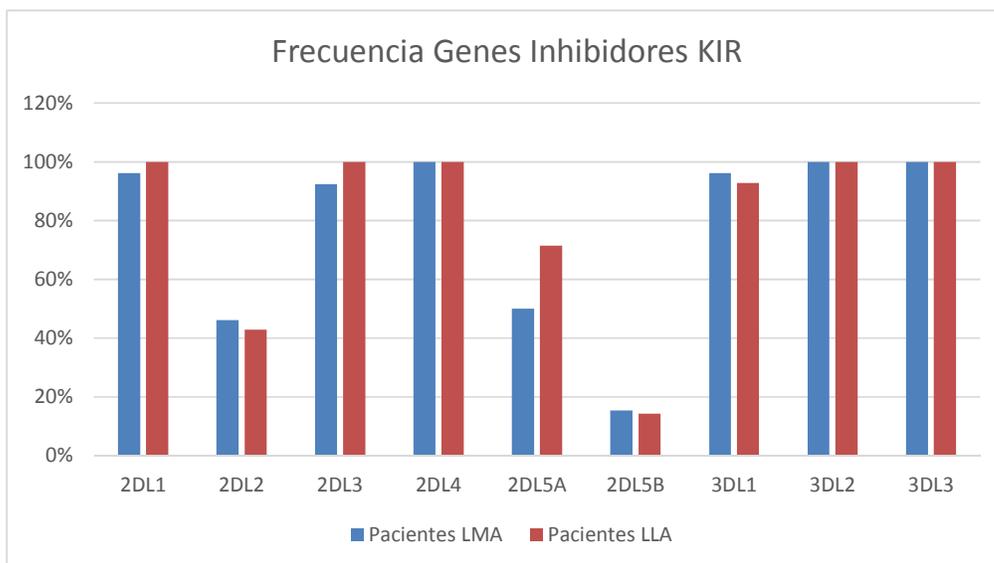


Gráfico 5. Se puede observar que no existe ninguna diferencia en la frecuencia de genes activadores entre pacientes con LMA y LLA, a pesar de que el gen KIR2DS3 muestre una diferencia amplia, la prueba de chi cuadrada no arroja una diferencia significativa.



Gráfica 6. No se encontró ninguna diferencia entre las frecuencias de genes inhibidores comparando pacientes con LMA y LLA. Se puede observar que el gen KIR2DL5B se encuentra en ambos grupos en un bajo porcentaje.

Tabla 6. Asociación de datos clínicos con variables genéticas de los receptores
KIR. Pacientes con LMA

	Sin EICH	EICH	Sin Recaída	Recaída	Vivos	Fallecidos
Post-Trasplante	9 (29%)	22 (71%)	24 (77%)	7 (23%)	25 (80%)	6 (20%)
Genotipo						
• <i>AA</i>	3 (33%)	1 (5%)	2 (8%)	2 (28%)	3 (12%)	1 (17%)
• <i>Bx</i>	6 (66%)	21 (95%)	22 (92%)	5 (72%)	22 (88%)	5 (93%)
Contenido de B						
• <i>0</i>	3 (33%)	1 (5%)	2 (8%)	2 (29%)	3 (12%)	1 (17%)
• <i>I</i>	1 (11%)	4 (18%)	2 (8%)	3 (43%)	3 (12%)	2 (33%)
• <i>2</i>	5 (56%)	13 (59%)	16 (67%)	2 (29%)	17 (68%)	1 (17%)
• <i>3</i>	0 (1%)	4 (18%)	4 (17%)	0 (0%)	2 (8%)	2 (33%)

Tabla 6 . En los pacientes con diagnóstico de LMA no se encontró ninguna asociación entre el genotipo KIR o el contenido de B, con la frecuencia de EICH, el riesgo de recaída o la sobrevida.

Tabla 7. Asociación de datos clínicos con variables genéticas de los receptores
KIR Pacientes LLA

	Sin EICH	EICH	Sin Recaída	Recaída	Vivos	Fallecidos
Post-Trasplante	3 (29%)	18 (71%)	18 (71%)	3 (29%)	17 (81%)	4 (19%)
Genotipo						
• <i>AA</i>	1 (33%)	0 (5%)	1 (8%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)
• <i>Bx</i>	2 (66%)	18 (95%)	17 (92%)	3 (100%)	17 (100%)	3 (75%)
Contenido de B						
• <i>0</i>	1 (33%)	0 (0%)	1 (6%)	0 (29%)	0 (0%)	1 (25%)
• <i>I</i>	0 (0%)	3 (17%)	2 (11%)	1 (33%)	2 (12%)	1 (25%)
• <i>2</i>	2 (67%)	13 (72%)	13(72%)	2 (66%)	14 (82%)	1 (25%)
• <i>3</i>	0 (0%)	2 (11%)	2 (11%)	0 (0%)	1 (6%)	1 (25%)

Tabla 7 . En los pacientes con diagnóstico de LLA no se encontró ninguna asociación entre el genotipo KIR o el contenido de B, con la frecuencia de EICH, el riesgo de recaída o la sobrevida.

En las tablas 6 y 7 podemos observar que ni en los pacientes con LMA ni en aquellos diagnosticados con LLA, se encontraron asociaciones del genotipo KIR o el contenido de B.

8 Discusión

La influencia que tienen los receptores KIR en el desarrollo clínico del paciente trasplantado, ha cobrado mucha importancia en la última década, pues se han descrito trabajos en donde se identifican algunas interacciones de dichos receptores con los antígenos HLA, permitiendo asociar una disminución en la frecuencia de recaída en aquellos pares paciente – donador haploidénticos.⁹⁹

Una de las diferencias que presenta este trabajo, es incluir como población de estudio a parejas paciente-donador HLA – compatibles, pues todos los estudios se enfocan en parejas haploidénticas, este aspecto es muy importante, al reducir la variable que puede suponer la presencia o ausencia de ciertos antígenos HLA en el paciente o el donador.

Una de las asociaciones más claras que encontramos, fue el mayor riesgo de aparición de EICH en pacientes cuyo donador posee genotipo Bx, este resultado es esperado, pues Ferrara⁸⁵ reportó lo mismo, sin embargo, la frecuencia reportada en su población fue del 60%, mientras nuestra frecuencia alcanzó el 75%.

Cooley⁷⁵ realiza una clasificación de los donadores de acuerdo a su contenido de B, ésta se basa en el hecho de que las células NK, que poseen un mayor contenido de B, muestran un elevado efecto citotóxico frente a células leucémicas, comparándolo contra aquellas células que poseen un genotipo inhibidor (AA). Esto ha permitido poder seleccionar a aquellos donadores con genotipos activadores y contenidos de B altos, para asegurar en el paciente un menor riesgo de recaída.

Basándonos en los resultados de Cooley⁷⁵, se esperaba obtener una relación entre un aumento en la frecuencia de aparición de la EICH y el contenido de B de los donadores. Sin embargo, los resultados que se obtuvieron no reflejan dicha asociación.

Cooley⁶⁹ reportó, en pacientes con LMA, que el genotipo y no el contenido de B se relaciona con un mayor riesgo de desarrollar EICH en los pacientes. Con la evidencia anterior y nuestros resultados, que no se enfocan solamente en un tipo específico de diagnóstico, podemos definir al genotipo KIR Bx o activador, como un factor de riesgo para el desarrollo de algún grado de EICH.

Cooley⁶⁹ también reportó que además de tener una relación con el aumento de casos de EICH en pacientes, el genotipo activador Bx se relaciona con un riesgo reducido de recaída. Sin embargo, dicho comportamiento solamente se encontraba presente en pacientes con LMA, ya que cuando analizaron a pacientes con LLA no encontraron dicha relación.

Basándonos en lo anterior, podemos justificar el que no hayamos encontrado una relación entre el genotipo KIR y el riesgo de recaída en el paciente, pues nuestra población de estudio no se encuentra separada por tipo de padecimiento.

A pesar de que no se pudo asociar el genotipo KIR y el riesgo de presentar recaída, si nos fue posible observar una relación entre el contenido de B=2 y el menor riesgo de recaer en la enfermedad. Además de este comportamiento, nuestros resultados nos permiten relacionar al contenido de B= 1 con un riesgo elevado de casi 5 veces más de presentar recaída. Este resultado es inquietante si consideramos que el contenido de B más bajo es 0 y corresponde al genotipo AA, que es en el que se esperaban mayores casos de recaída.

Con respecto a la sobrevida de los pacientes, se realizó un seguimiento que concluyó a los 700 días post-trasplante o al momento del fallecimiento, cuando así ocurriera. Si consideramos que el seguimiento es de casi dos años y que en este periodo de tiempo menos del 20% de los pacientes fallecen, podemos decir que el procedimiento ha sido exitoso, lo anterior, si lo comparamos con los resultados de Stussi⁵ y Cooley^{69,75}, en donde la sobrevida promedio de los pacientes a dos años de seguimiento es cercana al 50%.

Durante este estudio no se encontró ninguna asociación entre la presencia de cierto genotipo con una mayor o menor sobrevida en los pacientes, sin embargo, esta asociación no se ha descrito por ningún autor.

Se encontró una relación entre una mayor sobrevida y el contenido de B con puntaje 2, la cual se confirmó por prueba de chi cuadrada y analizando las curvas de sobrevida. En Ambos casos, los análisis estadísticos arrojaron que dicho contenido de B se asociaba con un mayor tiempo de vida.

Con este conjunto de datos podemos ir visualizando de manera general el panorama de nuestros pacientes con respecto a como van avanzando durante el trasplante y su relación con el genotipo KIR de su donador, pues si bien se relaciona al genotipo Bx con una alta incidencia de EICH, la presencia del dicho genotipo con contenido de B=2 se relaciona con una menor recaída a casi dos años de seguimiento y con una sobrevida superior al 60% en los pacientes.

Además de hacer un análisis general con genotipos y contenidos de B, se decidió hacer un análisis más detallado de los genes KIR considerándolos de manera individual. De esta manera solamente se encontró que la presencia del gen activador KIR2DS5 se asocia con una mayor probabilidad de desarrollar EICH, en 2008, Lanier⁴⁹ mencionó que la presencia de este gen se relacionada con bajos índices de recaídas en pacientes con LMA.

Hasta ese mismo año, el ligando del receptor KIR2DS5 era desconocido, sin embargo, se suponía era algún alelo del antígeno HLA-C, hasta la fecha, dicha suposición sigue vigentes pues aún no se reporta con certeza la identidad de dicho ligando.

Puesto que los trabajos citados hasta el momento, cuentan como población de estudio, pacientes con cierto diagnóstico, se decidió hacer una separación entre nuestro grupo de pacientes, separándolos en dos grupos de acuerdo a si padecían LMA o LLA, al ser los diagnósticos más comunes.

Como se puede ver en la tabla 5, a pesar de que numéricamente existe una diferencia considerable entre pacientes con LMA y LLA, estadísticamente no tienen ninguna significancia.

Además de no encontrar diferencias entre la frecuencia de puntajes, o genotipos, tampoco se observó una diferencia en el tiempo de reconstitución inmunológica, pues ambos grupos recuperaron el conteo normal de neutrófilos a los 14 días en promedio.

El mismo procedimiento de comparación entre las variables clínicas y genotípicas se realizó en cada uno de los dos grupos de pacientes, sin embargo en ninguno de los casos se logró encontrar una asociación, ya sea de genotipo, de contenido de B o con respecto a los genes individuales.

Trabajos como el de Cooley⁷⁵ reportan la asociación de los receptores KIR con el desarrollo del trasplante de células hematopoyéticas se realizaron en pacientes con LMA, sin embargo en nuestros resultados no pudimos observar ninguno de los comportamientos reportados.

Una de las posibles causas de que no hayamos encontrado asociación es que el tamaño de la muestra es pequeña, sin embargo, podemos decir que la tendencia de los resultados generales se sigue presentando, aunque no con diferencias significativas en nuestros pacientes con LMA.

El hecho de que existan comportamientos distintos conforme la enfermedad se ha tratado de explicar con base en la expresión de antígenos de las células blásticas. Aunque no se tienen descritos los ligandos que podrían estarse presentando en las distintas enfermedades que pudieran interactuar con las células NK y favorecer su activación existen identificados algunos de los ligandos que inhiben su perfil citotóxico.

El tamaño del grupo de estudio constituido por pacientes con LLA es aún más pequeña, sin embargo en este grupo si podemos encontrar una asociación del contenido de B con la supervivencia de los pacientes.

9 Conclusiones.

Se encontró que las variantes genéticas de los receptores KIR tienen una relación con el desarrollo clínico de pacientes sometidos a trasplante de células hematopoyéticas.

La presencia del genotipo Bx en el donador, se asocia a una mayor frecuencia de aparición de EICH, sin que esto se relacione con una disminución de la sobrevida del paciente.

El contenido de B con puntaje 2, se asocia a un bajo riesgo de recaída y además a una mayor sobrevida en pacientes después de 2 años de seguimiento.

No se encontró ninguna diferencia en la frecuencia de EICH, el riesgo de recaída o la sobrevida de pacientes en grupos con diagnósticos específicos.

10 Literatura citada.

1. Aversa, F., *New forms of transplantation: haploidentical transplants*. Bone Marrow Transplant, 2001. **28 Suppl 1**: p. S16-7.
2. Copelan, E.A., *Hematopoietic stem-cell transplantation*. N Engl J Med, 2006. **354**(17): p.1813-26.
3. Passweg, J.R., et al., *Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2012 with special consideration of pediatric transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2014. **49**(6): p. 744-50.
4. Kottaridis, P.D., et al., *In vivo CAMPATH-1H prevents graft-versus-host disease following nonmyeloablative stem cell transplantation*. Blood, 2000. **96**(7): p. 2419-25.
5. Stussi, G., et al., *Graft-versus-host disease and survival after ABO-incompatible allogeneic bone marrow transplantation: a single-centre experience*. Br J Haematol, 2001. **113**(1): p. 251-3.
6. Bortin, M.M., *A compendium of reported human bone marrow transplants*. Transplantation, 1970. **9**(6): p. 571-87.
7. Leon-Rodriguez, E., *[Hematopoietic stem-cell transplantation: a long way, from animal models to a standard treatment in human]*. Rev Invest Clin, 2005. **57**(2): p. 129-31.
8. Holdsworth, R., et al., *The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens*. Tissue Antigens, 2009. **73**(2): p. 95-170.
9. Morishima, Y., *[Hematopoietic stem cell transplantation]*. Nihon Rinsho, 2005. **63 Suppl 4**: p. 690-4.
10. Leon, E. and R. Sosa, *[Bone marrow transplantation in Mexico. Report of the 1st successful case in acute myeloblastic leukemia. Grupo de Trasplante Medular Oseo del INNSZ]*. Rev Invest Clin, 1992. **44**(3): p. 383-6.
11. Sanchez, R.S., et al., *[Bone marrow transplant in aplastic anemia. Report of the first case in Mexico (author's transl)]*. Rev Invest Clin, 1980. **32**(1): p. 49-55.
12. Morales-Polanco, M.R. and J. Pizzuto-Chavez, *[Bone marrow transplant in aplastic anemia. Current status and review of the first allogeneic transplants in Mexico]*. Gac Med Mex, 1984. **120**(2): p. 49-57.
13. Ruiz-Arguelles, G.J., *Allogeneic stem cell transplantation using non-myeloablative conditioning regimens: results of the Mexican approach*. Int J Hematol, 2002. **76 Suppl 1**: p. 376-9.
14. Ruiz-Arguelles GJ, Gómez-Almaguer. *Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en México*. Acta Médica Grupo Ángeles. 2006; 4 (1): 25-28.
15. Stussi, G., et al., *Consequences of ABO incompatibility in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2002. **30**(2): p. 87-93.
16. Mayani, H., J.A. Alvarado-Moreno, and P. Flores-Guzman, *Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation*. Arch Med Res, 2003. **34**(6): p. 476-88.
17. Vriesendorp, H.M., *Aims of conditioning*. Exp Hematol, 2003. **31**(10): p. 844-54.

18. Oevermann, L., et al., *Immune reconstitution and strategies for rebuilding the immune system after haploidentical stem cell transplantation*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1266**: p. 161-70.
19. Ishida, H., et al., *Anti-AB titer changes in patients with ABO incompatibility after living related kidney transplantations: survey of 101 cases to determine whether splenectomies are necessary for successful transplantation*. Transplantation, 2000. **70**(4): p. 681-5.
20. Rydberg, L., *ABO-incompatibility in solid organ transplantation*. Transfus Med, 2001. **11**(4): p. 325-42.
21. Morales VH. Sistema HLA, Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas y búsqueda de donante no emparentado. *Hematología*. 2014; 18: 240-249.
22. Klein, J. and A. Sato, *The HLA system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(10): p. 702-9.
23. Marsh, S.G. and H.L.A.S. Who Nomenclature Committee for Factor of the, *Nomenclature for factors of the HLA system, update March 2002*. Tissue Antigens, 2002. **59**(3): p. 239-40.
24. Colonna, M., et al., *HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 12000-4.
25. Ottinger, H.D., et al., *Hematopoietic stem cell transplantation: contrasting the outcome of transplantations from HLA-identical siblings, partially HLA-mismatched related donors, and HLA-matched unrelated donors*. Blood, 2003. **102**(3): p. 1131-7.
26. Arai, S. and H.G. Klingemann, *Hematopoietic stem cell transplantation: bone marrow vs. mobilized peripheral blood*. Arch Med Res, 2003. **34**(6): p. 545-53.
27. Mayani, H. and P.M. Lansdorp, *Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells*. Stem Cells, 1998. **16**(3): p. 153-65.
28. Leary, A.G., et al., *Single cell origin of multilineage colonies in culture. Evidence that differentiation of multipotent progenitors and restriction of proliferative potential of monopotent progenitors are stochastic processes*. J Clin Invest, 1984. **74**(6): p. 2193-7.
29. Singh, V.K., et al., *Manufacturing blood ex vivo: a futuristic approach to deal with the supply and safety concerns*. Front Cell Dev Biol, 2014. **2**: p. 26.
30. Hadavi, R., et al., *Production of Monoclonal Antibody against Human Nestin*. Avicenna J Med Biotechnol, 2010. **2**(2): p. 69-77.
31. Aghebati Maleki, L., et al., *Generation and Characterization of Anti-CD34 Monoclonal Antibodies that React with Hematopoietic Stem Cells*. Cell J, 2014. **16**(3): p. 361-6.
32. Guggenheim, R., et al., *Bone marrow transplantation for cartilage-hair-hypoplasia*. Bone Marrow Transplant, 2006. **38**(11): p. 751-6.
33. Marks, D.I., et al., *A comparison of cyclophosphamide and total body irradiation with etoposide and total body irradiation as conditioning regimens for patients undergoing sibling allografting for acute lymphoblastic leukemia in first or second complete remission*. Biol Blood Marrow Transplant, 2006. **12**(4): p. 438-53.
34. Bacigalupo, A., et al., *Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions*. Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(12): p. 1628-33.

35. Giralt, S., et al., *Melphalan and purine analog-containing preparative regimens: reduced-intensity conditioning for patients with hematologic malignancies undergoing allogeneic progenitor cell transplantation*. *Blood*, 2001. **97**(3): p. 631-7.
36. Bacigalupo, A., *Third EBMT/AMGEN Workshop on reduced-intensity conditioning allogeneic haemopoietic stem cell transplants (RIC-HSCT), and panel consensus*. *Bone Marrow Transplant*, 2004. **33**(7): p. 691-6.
37. Giralt, S., et al., *Reduced-intensity conditioning regimen workshop: defining the dose spectrum. Report of a workshop convened by the center for international blood and marrow transplant research*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009. **15**(3): p. 367-9.
38. Niederwieser, D., et al., *Low-dose total body irradiation (TBI) and fludarabine followed by hematopoietic cell transplantation (HCT) from HLA-matched or mismatched unrelated donors and postgrafting immunosuppression with cyclosporine and mycophenolate mofetil (MMF) can induce durable complete chimerism and sustained remissions in patients with hematological diseases*. *Blood*, 2003. **101**(4): p. 1620-9.
39. Taussig, D.C., et al., *Durable remissions of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia after reduced-intensity allografting*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(16): p. 3060-5.
40. Feinstein, L.C., et al., *Non-myeloablative allografting from human leucocyte antigen-identical sibling donors for treatment of acute myeloid leukaemia in first complete remission*. *Br J Haematol*, 2003. **120**(2): p. 281-8.
41. Cordonnier, C., et al., *Do minitransplants have minicosts? A cost comparison between myeloablative and nonmyeloablative allogeneic stem cell transplant in patients with acute myeloid leukemia*. *Bone Marrow Transplant*, 2005. **36**(7): p. 649-54.
42. Bosch, M., F.M. Khan, and J. Storek, *Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation*. *Curr Opin Hematol*, 2012. **19**(4): p. 324-35.
43. Cichocki, F., E. Sitnicka, and Y.T. Bryceson, *NK cell development and function--plasticity and redundancy unleashed*. *Semin Immunol*, 2014. **26**(2): p. 114-26.
44. Seggewiss, R. and H. Einsele, *Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update*. *Blood*, 2010. **115**(19): p. 3861-8.
45. Kiessling, R., E. Klein, and H. Wigzell, *"Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype*. *Eur J Immunol*, 1975. **5**(2): p. 112-7.
46. Yu, J., A.G. Freud, and M.A. Caligiuri, *Location and cellular stages of natural killer cell development*. *Trends Immunol*, 2013. **34**(12): p. 573-82.
47. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(5): p. 503-10.
48. Flodstrom-Tullberg, M., et al., *Natural killer cells in human autoimmunity*. *Curr Opin Immunol*, 2009. **21**(6): p. 634-40.
49. Lanier, L.L., *Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(5): p. 495-502.
50. Bezman, N.A., et al., *Molecular definition of the identity and activation of natural killer cells*. *Nat Immunol*, 2012. **13**(10): p. 1000-9.

51. Vosshenrich, C.A. and J.P. Di Santo, *Developmental programming of natural killer and innate lymphoid cells*. *Curr Opin Immunol*, 2013. **25**(2): p. 130-8.
52. Thomas, E.D., et al., *One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation*. *Blood*, 1977. **49**(4): p. 511-33.
53. Oevermann, L. and R. Handgretinger, *New strategies for haploidentical transplantation*. *Pediatr Res*, 2012. **71**(4 Pt 2): p. 418-26.
54. Federmann, B., et al., *Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic cell transplantation: impact of reduced intensity conditioning and CD3/CD19 depleted grafts*. *Leukemia*, 2011. **25**(1): p. 121-9.
55. Caligiuri, M.A., *Human natural killer cells*. *Blood*, 2008. **112**(3): p. 461-9.
56. Yoon, S.R., J.W. Chung, and I. Choi, *Development of natural killer cells from hematopoietic stem cells*. *Mol Cells*, 2007. **24**(1): p. 1-8.
57. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. *Trends Immunol*, 2001. **22**(11): p. 633-40.
58. Smyth, M.J., et al., *New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(11): p. 850-61.
59. <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html>
60. Hudspeth, K., B. Silva-Santos, and D. Mavilio, *Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 69.
61. Middleton, D., M. Curran, and L. Maxwell, *Natural killer cells and their receptors*. *Transpl Immunol*, 2002. **10**(2-3): p. 147-64.
62. Rajalingam, R., *Overview of the killer cell immunoglobulin-like receptor system*. *Methods Mol Biol*, 2012. **882**: p. 391-414.
63. Lanier, L.L., *NK cell recognition*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 225-74.
64. Khakoo, S.I. and M. Carrington, *KIR and disease: a model system or system of models?* *Immunol Rev*, 2006. **214**: p. 186-201.
65. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. *Immunol Today*, 1990. **11**(7): p. 237-44.
66. Boyton, R.J. and D.M. Altmann, *Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease*. *Clin Exp Immunol*, 2007. **149**(1): p. 1-8.
67. Dorak, M.T., *Role of natural killer cells and killer immunoglobulin-like receptor polymorphisms: association of HLA and KIRs*. *Methods Mol Med*, 2007. **134**: p. 123-44.
68. Uhrberg, M., et al., *Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes*. *Immunity*, 1997. **7**(6): p. 753-63.
69. Cooley, S., et al., *Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia*. *Blood*, 2009. **113**(3): p. 726-32.
70. Pende, D., et al., *Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity*. *Blood*, 2009. **113**(13): p. 3119-29.

71. Wagtmann, N., et al., *Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer*. *Immunity*, 1995. **3**(6): p. 801-9.
72. Gumperz, J.E., et al., *The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor*. *J Exp Med*, 1995. **181**(3): p. 1133-44.
73. Pende, D., et al., *The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer*. *J Exp Med*, 1996. **184**(2): p. 505-18.
74. Jamil, K.M. and S.I. Khakoo, *KIR/HLA interactions and pathogen immunity*. *J Biomed Biotechnol*, 2011. **2011**: p. 298348.
75. Cooley, S., et al., *Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia*. *Blood*, 2010. **116**(14): p. 2411-9.
76. Hoteit, R., et al., *KIR genotype distribution among patients with multiple myeloma: Higher prevalence of KIR 2DS4 and KIR 2DS5 genes*. *Meta Gene*, 2014. **2**: p. 730-6.
77. Roberts, C.H., et al., *Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor gene linkage and copy number variation analysis by droplet digital PCR*. *Genome Med*, 2014. **6**(3): p. 20.
78. Venstrom, J.M., et al., *Donor activating KIR3DS1 is associated with decreased acute GVHD in unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. *Blood*, 2010. **115**(15): p. 3162-5.
79. Middleton, D. and F. Gonzelez, *The extensive polymorphism of KIR genes*. *Immunology*, 2010. **129**(1): p. 8-19.
80. Moesta, A.K. and P. Parham, *Diverse functionality among human NK cell receptors for the C1 epitope of HLA-C: KIR2DS2, KIR2DL2, and KIR2DL3*. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 336.
81. David, G., et al., *Large spectrum of HLA-C recognition by killer Ig-like receptor (KIR)2DL2 and KIR2DL3 and restricted C1 SPECIFICITY of KIR2DS2: dominant impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK cell repertoire formation*. *J Immunol*, 2013. **191**(9): p. 4778-88.
82. Leather, H.L. and J.R. Wingard, *Infections following hematopoietic stem cell transplantation*. *Infect Dis Clin North Am*, 2001. **15**(2): p. 483-520.
83. Ninin, E., et al., *Longitudinal study of bacterial, viral, and fungal infections in adult recipients of bone marrow transplants*. *Clin Infect Dis*, 2001. **33**(1): p. 41-7.
84. Schroeder, M.A. and J.F. DiPersio, *Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations*. *Dis Model Mech*, 2011. **4**(3): p. 318-33.
85. Ferrara, J.L., et al., *Graft-versus-host disease*. *Lancet*, 2009. **373**(9674): p. 1550-61.
86. Farag, S.S., et al., *Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect*. *Blood*, 2002. **100**(6): p. 1935-47.
87. Jiang, Y.Z. and J. Barrett, *The allogeneic CD4+ T-cell-mediated graft-versus-leukemia effect*. *Leuk Lymphoma*, 1997. **28**(1-2): p. 33-42.

88. Blazar, B.R., W.J. Murphy, and M. Abedi, *Advances in graft-versus-host disease biology and therapy*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(6): p. 443-58.
89. Choi, S.W., J.E. Levine, and J.L. Ferrara, *Pathogenesis and management of graft-versus-host disease*. Immunol Allergy Clin North Am, 2010. **30**(1): p. 75-101.
90. Kaplan, D.H., et al., *Target antigens determine graft-versus-host disease phenotype*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5467-75.
91. Bleakley, M. and S.R. Riddell, *Exploiting T cells specific for human minor histocompatibility antigens for therapy of leukemia*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(3): p. 396-407.
92. Biomarkers Definitions Working, G., *Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework*. Clin Pharmacol Ther, 2001. **69**(3): p. 89-95.
93. May, A. and T.J. Wang, *Biomarkers for cardiovascular disease: challenges and future directions*. Trends Mol Med, 2008. **14**(6): p. 261-7.
94. Flomenberg, N., et al., *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**(7): p. 1923-30.
95. Hansen, J.A., et al., *Defining genetic risk for graft-versus-host disease and mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Curr Opin Hematol, 2010. **17**(6): p. 483-92.
96. Harris, A.C., J.L. Ferrara, and J.E. Levine, *Advances in predicting acute GVHD*. Br J Haematol, 2013. **160**(3): p. 288-302.
97. Ajit, S.K., *Circulating microRNAs as biomarkers, therapeutic targets, and signaling molecules*. Sensors (Basel), 2012. **12**(3): p. 3359-69.
98. Ranganathan, P., et al., *Regulation of acute graft-versus-host disease by microRNA-155*. Blood, 2012. **119**(20): p. 4786-97.
99. Ruggieri, L., et al., *Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants*. Science, 2002. **295**(5462): p. 2097-100.

11 Anexo 1. Carta de consentimiento informado.

	INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL <small>SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL</small>
	INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (ADULTOS)
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN	
Nombre del estudio:	_____
Patrocinador externo (si aplica):	_____
Lugar y fecha:	_____
Número de registro:	_____
Justificación y objetivo del estudio:	_____
Procedimientos:	_____
Posibles riesgos y molestias:	_____
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	_____
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	_____
Participación o retiro:	_____
Privacidad y confidencialidad:	_____
En caso de colección de material biológico (si aplica):	
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	No autoriza que se tome la muestra. Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio. Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros.
Disponibilidad de tratamiento médico en derechohabientes (si aplica): _____	
Beneficios al término del estudio: _____	
En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:	
Investigador Responsable:	_____
Colaboradores:	_____
En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores, México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx	
_____ Nombre y firma del sujeto	_____ Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento
_____ Testigo 1	_____ Testigo 2
_____ Nombre, dirección, relación y firma	_____ Nombre, dirección, relación y firma
Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio	
Clave: 2810-009-013	